



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Evaluación de la respuesta inmune inducida por la proteína E2 del virus de la diarrea viral bovina en un modelo murino”

TESIS

Que para optar por el grado de Doctora en Ciencias

PRESENTA

Ninnet Evelyn Gómez Romero

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Carlos F. Arias Ortiz

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Enrique Merino Pérez

Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis padres, Graciela Romero Vértiz y Francisco Gómez Franco, por todo su amor y cariño incondicional, ustedes son fuente de mi motivación e inspiración diaria. Gracias por guiarme con sus sabios consejos a lo largo de mi vida. No podría consolidar ninguna meta si no fuera por su apoyo y confianza, valoro todo su esfuerzo y admiro todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanas, Shanty y Mimi, por siempre estar a mi lado, por su cariño y consejos que me han ayudado a ser una mejor persona. Por ser un gran ejemplo de dedicación y resiliencia para superar los retos diarios y sobre todo por agregarle mucha alegría a mi vida. Por compartir su vida conmigo y apoyarme en cada paso.

A Renata e Íñigo, que son mi motivación diaria.

A Rodo, por tu apoyo y motivación incondicional durante este proceso. Por ser mi ejemplo de determinación, esfuerzo y dedicación. Por ser mi mejor equipo para todo. Por compartir conmigo los mejores momentos y ayudarme a enfrentar los difíciles, porque con tu amor y paciencia he podido concluir esta meta. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A la FMVZ-UNAM por la formación académica y darme una identidad como profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sustentar mis estudios de posgrado.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT) IN217219 "Identificación y caracterización genética de cepas del virus de la diarrea viral bovina circulantes en poblaciones ganaderas de México" por otorgar el financiamiento para el desarrollo del presente proyecto.

Al Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara por su incansable apoyo e interés en desarrollo de este trabajo. Gracias por confiar en mí, por todos los consejos, pláticas para el mejoramiento de esta tesis, pero sobre todo por su confianza.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por su asesoría durante este proceso, por sus consejos que enriquecieron el trabajo de investigación y por prepararme profesionalmente.

Al Dr. Carlos F. Arias Ortiz por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en su laboratorio y aprender de su grupo de trabajo, por haber sido una guía en una parte crucial de mi doctorado. Por su asesoría, tiempo y disposición para resolver dudas en todo momento, cada una de sus aportaciones fueron valiosas tanto para el desarrollo del presente trabajo como de mi vida profesional y personal.

A la Dra. Susana López Charretón por su asesoría, consejos y contribuciones que, además de invaluable, contribuyeron en el desarrollo y mejoramiento de esta tesis. Por el apoyo y orientación profesional durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Enrique Merino que formó parte de mi comité tutor, por sus comentarios y sugerencias enriquecieron el desarrollo del presente proyecto.

Al M. en C. Marco Antonio Espinoza Torres por su constante asesoría y apoyo técnico durante mi estancia en su laboratorio.

A los miembros del grupo Arias/López (Nayeli, Carlos B, Carlos S, Joaquín, Lety, Ari, Jey, Marco, Poncho, José Luis, Pavel, Tomas, Cat, Jey, Saul, Connie, Blanca) por los conocimientos compartidos y la agradable convivencia durante mi estancia en su laboratorio.

A los miembros jurado evaluador de la tesis: Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz, Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dr. Carlos F. Arias Ortiz, Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara y Lauro Velazquez Salinas. Gracias por sus comentarios, sugerencias y correcciones, que contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CP	Citopático
db	Decibeles
DVB	Diarrea viral bovina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EM	Enfermedad de las mucosas
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
H&E	Hematoxilina y eosina
HEK293T	<i>Human embryonic kidney cells containing T antigen</i>
HVB-1	Herpesvirus bovino tipo 1
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
kb	kilobases
kDa	Kilodaltones
LDLr	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>
MALT	<i>Mucosa associated lymphoid tissue</i>
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
NADL	<i>National Animal Disease Laboratory</i>
NCP	No citipático
nm	Nanómetros
OG	Orogástrica
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> ; marco de lectura
PAGE	<i>Polyacrylamide gels</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI	Persistentemente infectado
PI3	Virus parainfluenza 3
RT-PCR	<i>Reverse transcription- Polymerase Chain Reaction</i>
SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SPF	<i>specific pathogen free</i>
SSF	solución salina fisiológica
TWHCA	<i>Two-way Hierarchical Cluster Analysis</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> ; región no traducida
VCoB	Coronavirus bovino
VDVB	Virus de la diarrea viral bovina
VDVB-1	Virus de la diarrea viral bovina tipo 1
VDVB-2	Virus de la diarrea viral bovina tipo 2
VEF	Virus de la enfermedad de las fronteras
VFPC	Virus de la fiebre porcina clásica
VNT	Título de neutralización viral
VSRB	Virus sincitial respiratorio bovino

CONTENIDO

Tema		Página
Resumen		IV
Abstract		V
Abreviaturas		VI
1.	Introducción	1
1.1	Antecedentes	1
1.2	Clasificación taxonómica	2
1.2.1	Genotipos, subgenotipos y biotipos	4
1.3	Morfología	6
1.4	Propiedades fisicoquímicas	7
1.5	Genoma viral	7
1.6	Replicación viral	9
1.7	Patogenia y patogénesis de la DVB	13
1.7.1	Contaminación por el VDVB	17
1.8	Situación actual de la DVB	18
1.9	Control	20
2.	Justificación	23
3.	Hipótesis	24
4.	Objetivos	25
4.1	Objetivo general	25
4.2	Objetivos específicos	25
5.	Material y métodos	26
5.1	Cepa de referencia y mantenimiento	26
5.2	Amplificación de fragmento del gen E2	26
5.2.1	Extracción de ARN	26
5.2.2	RT-PCR	27
5.3	Clonación	29
5.3.1	Clonación en vector pET100/D-TOPO	29
5.3.2	Clonación en vector pSecTag2/HygroA	31
5.4	Secuenciación de plásmidos pET-E2 y pSecTagE2	33
5.5	Extracción y purificación de plásmidos	34
5.6	Inducción de la proteína recombinante E2	34
5.6.1	Western blot	34
5.6.2	Purificación de proteína recombinante de bacteria	35
5.7	Transfección del plásmido pSecTagE2	35
5.7.1	Western blot	36
5.7.2	Purificación de proteína recombinante de células eucariontes	36
5.7.3	Cuantificación de proteínas	37

5.8	Ensayo de inmunización	37
5.8.1	Ratones Balb/c	37
5.8.2	Protocolo de inmunización	38
5.8.3	Titulación de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB	41
5.8.4	Determinación de eficiencia protectora en animales inmunizados	41
5.8.4.1	Extracción de ARN y RT-PCR a partir de órganos	42
5.8.4.1.1	Análisis jerárquico de conglomerados	43
5.8.4.2	Histopatología	43
5.8.4.3	Inmunohistoquímica	44
5.8.4.3.1	Análisis estadístico	46
6.	Resultados	47
6.1	Amplificación de fragmento del gen E2	47
6.2	Secuenciación de los plásmidos pET-E2 y pSecTagE2	48
6.3	Inducción de la proteína recombinante	49
6.3.1	Análisis de proteínas	49
6.3.2	<i>Western blot</i> de proteína E2 recombinante	51
6.3.3	Purificación de la proteína recombinante	52
6.4	Transfección del plásmido pSecTagE2	52
6.4.1	<i>Western blot</i> de proteína recombinante	52
6.4.2	Purificación de la proteína recombinante	55
6.5	Signos clínicos en animales de experimentación	55
6.6	Titulación de anticuerpos neutralizantes	57
6.7	RT-PCR a partir de órganos	62
6.7.1	Análisis jerárquico de conglomerados	66
6.8	Histopatología	68
6.9	Inmunohistoquímica	76
6.9.1	Evaluación de la eficacia protectora de la proteína E2 recombinante	83
7	Discusión	87
8	Conclusiones	93
9	Prospectiva	93
10	Referencias	95
11	Anexos	107
11.1	Anexo 1. Grupos experimentales e identificación de animales	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.1	Morfología y organización del genoma del VDVB	8
1.2	Manifestaciones clínicas causadas por la infección con el VDVB	16
5.1	Condiciones de la RT-PCR para primers E2e	28
5.2	Condiciones de la RT-PCR para primers E2p	28
5.3	Mapa del vector pET100/D-TOPO	29
5.4	Mapa del vector pET-E2	30
5.5	Mapa del vector pSecTag2/Hygro A	31
5.6	Mapa del vector pSecTagE2	33
5.7	Esquematización del protocolo de inmunización y desafío	39
5.8	Ilustración del seno retro-orbital	39
5.9	Inoculación vía orogástrica de cepa de desafío	40
5.10	Obtención de temperatura corporal y peso	40
5.11	Condiciones de la RT-PCR para iniciadores 5UTR/START	43
6.1	Productos de la RT-PCR utilizando los iniciadores E2p y E2e	47
6.2	Esquema del gen de la glicoproteína E2 del VDVB	47
6.3	Análisis de secuencia del plásmido pET-E2	48
6.4	Análisis de secuencia del plásmido pSecTagE2	49
6.5	Inducción de la proteína a 27°C	50
6.6	Inducción de la proteína a 37°C	50
6.7	Determinación de la insolubilidad de proteína recombinante	51
6.8	<i>Western blot</i> de proteína E2 recombinante	51
6.9	Purificación de proteína	52
6.10	<i>Western blots</i> de proteína recombinante	53
6.11	Formación de islas celulares	54
6.12	<i>Western blots</i> de proteína recombinante	54
6.13	Purificación de proteína	55
6.14	Temperatura corporal post desafío	56
6.15	Peso corporal post desafío	57
6.16	Título de anticuerpos neutralizantes	58
6.17	Título de anticuerpos neutralizantes grupos 1, 2, 3 y 4	59
6.18	Análisis jerárquico de conglomerados	67
6.19	Cambios histopatológicos	70
6.20	Inmunohistoquímica para la detección del VDVB	78
6.21	Resultados de IHQ 7 días post desafío	84
6.22	Resultados de IHQ 21 días post desafío	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1.1	Clasificación de <i>Pestivirus</i> por el ICTV	3
1.2	Especies de virus propuestos para el género <i>Pestivirus</i>	4
1.3	Características de las proteínas del VDVB	10
5.1	Iniciadores utilizados para amplificar el gen E2 del VDVB	27
5.2	Iniciadores utilizados para amplificar el gen E2 del VDVB	27
5.3	Reactivos y concentraciones utilizados para la RT	27
5.4	Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR	28
5.5	Iniciadores utilizados para amplificar la región 5'UTR	42
6.1	Niveles de significancia estadística	59
6.2	Resultados de la neutralización viral	61
6.3	Resultados de la RT-PCR a partir de órganos	62
6.4	Resultados de histopatología	71
6.5	Resultados de Inmunohistoquímica	79

1. Introducción

1.1 Antecedentes

La diarrea viral bovina (DVB) fue descrita en 1946 de manera simultánea en Estados Unidos y Canadá, como una enfermedad que afectaba al ganado bovino; dicha enfermedad se caracterizó por la presencia de signos como leucopenia, depresión, fiebre, diarrea, deshidratación, anorexia, sialorrea, descarga nasal, hemorragias y erosiones gastrointestinales (Olafson *et al.*, 1946; Childs, 1946). Posterior a este año, las investigaciones sobre la DVB se enfocaron en discernir la patogenia de la enfermedad y los agentes etiológicos involucrados.

En 1957, se logró aislar el agente causal, el cual fue denominado virus de la diarrea viral bovina (VDVB) (Underdahl *et al.*, 1957). De manera subsecuente, por medio de ensayos de neutralización viral, se demostró que el VDVB estaba relacionado antigénicamente con el virus de la fiebre porcina clásica (VFPC) y el virus de la enfermedad de las fronteras (VEF) (Darbyshire, 1962; Plant *et al.*, 1973). Por lo tanto, basándose en sus características morfológicas, la presencia de envoltura y la cadena ARN positiva, a éste grupo de virus se les acuñó el género viral *Pestivirus*, clasificado dentro de la familia *Togaviridae* (Baker 1987). Sin embargo, los avances en la caracterización molecular, expresión génica y estrategias de replicación permitieron reclasificar a los *Pestivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*; clasificación que se conserva en la actualidad (Simmonds *et al.*, 2017).

En las décadas de los 70's y 80's, se logró discernir la patogénesis de la DVB al realizar infecciones experimentales en bovinos. Lo anterior, permitió establecer los factores virales y fisiológicos de los animales involucrados en el desarrollo de las diversas presentaciones clínicas de la DVB (Brownlie *et al.*, 1987).

En esta época, se comenzaron a reportar diversos brotes de la DVB en diferentes países; sin embargo, las manifestaciones agudas y graves de la enfermedad variaban de una región a otra, lo cual sugería que existía variación en

la virulencia de las cepas de VDVB (Carman *et al.*, 1998; Pellerin *et al.*, 1994; David *et al.*, 1994).

El aislamiento de los virus que generaban los brotes y su subsecuente secuenciación permitieron clasificar a los VDVB en grupos o genotipos. Después de dicha segregación, se comenzó a realizar la caracterización genética de virus aislados a partir de bovinos y ovinos domésticos, así como de ungulados silvestres de diversos países (Vilcek *et al.*, 2001; Pellerin *et al.*, 1994; Becher *et al.*, 1997). Como resultado, se propuso una clasificación en biotipos, genotipos y subgenotipos del VDVB; siendo ésta última aún materia de discusión. Sin embargo, la segregación por subgenotipos es ampliamente utilizada en estudios de epidemiología molecular y ha sido útil para determinar la prevalencia de los VDVB que circulan tanto en poblaciones ganaderas, como en animales silvestres en diferentes regiones del mundo (Kadir *et al.*, 2008; Booth *et al.*, 2013; Jenckel *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2015).

1.2 Clasificación taxonómica

El VDVB está clasificado en el género *Pestivirus*, que pertenece a la familia *Flaviviridae*. Por varias décadas, el virus de la diarrea viral tipo 1 (VDVB-1), el tipo 2 (VDVB-2), el VFPC y el VEF fueron las cuatro especies virales reconocidas dentro del género viral. Sin embargo, en los últimos años los virus bajo el género *Pestivirus* han experimentado una exhaustiva revisión taxonómica permitiendo la clasificación o reclasificación de sus miembros. Actualmente, el género *Pestivirus* está conformado por 11 especies reconocidas por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) denominadas *Pestivirus A* hasta *Pestivirus K* (Cuadro 1.1). De éstas, el *Pestivirus A*, *Pestivirus B* y *Pestivirus H* corresponden al VDVB-1, el tipo VDVB-2 y VDVB tipo 3 o HoBi-like, respectivamente. Así mismo, dentro de éste género se incluyen virus de interés veterinario que se han detectado en animales ungulados domésticos, y silvestres y ratas (Simmonds *et al.*, 2019). De manera subsecuente, estudios recientes proponen la inclusión de 8 nuevas

especies (*Pestivirus L* al *Pestivirus S*) al género *Pestivirus*, aunque requieren de mayor análisis y aceptación como pestivirus tentativos por parte del ICTV.

(Cuadro 1.2) (Postel *et al.*, 2021). Así mismo, el pestivirus de murciélago se mantiene como un virus relacionado al género de los *Pestivirus*; sin embargo, se requieren secuencias completas y estudios adicionales para ser considerado como miembro de dicho género viral (Simmonds *et al.*, 2019).

Especies del género <i>Pestivirus</i>				
Especie viral	Nombre del virus	Nombre del aislamiento	Número de acceso	Abreviatura virus
<i>Pestivirus A</i>	Virus de la diarrea viral bovina 1	SD-1	M96751	BVDV 1
<i>Pestivirus B</i>	Virus de la diarrea viral bovina 2	890	FJ527854	BVDV 2
<i>Pestivirus C</i>	Virus de la Fiebre Porcina Clásica	Alfort/187	X87939	CSFV
<i>Pestivirus D</i>	Virus de la enfermedad de la frontera	X818	AF037405	BDV
<i>Pestivirus E</i>	Pestivirus del antílope berrendo		AY781152	PaPeV
<i>Pestivirus F</i>	Pestivirus porcino	Bungowannah	EF100713	PPeV
<i>Pestivirus G</i>	Pestivirus de la jirafa	H138	AF144617	GPeV
<i>Pestivirus H</i>	Pestivirus HoBi-like	Th/04_KhonKahen	FJ040215	HoBiPeV
<i>Pestivirus I</i>	Pestivirus Aydin-like	04-TR	JX428945	AydinPeV
<i>Pestivirus J</i>	Pestivirus de rata	NrPV/NYC-D23	KJ950914	RPeV
<i>Pestivirus K</i>	Pestivirus atípico porcino	515	KR011347	APPeV

Cuadro 1.1 Clasificación de pestivirus por el ICTV. (Modificado de Simmonds *et al.*, 2019)

Especies del género *Pestivirus*

Espece viral	Nombre del virus	Hospedador	Número de acceso	Abreviatura virus
<i>Pestivirus L</i>	Linda virus	<i>Sus scrofa</i>	NC035432	LindaV
<i>Pestivirus M</i>	Phocoena pestivirus	<i>Phocoena phocoena</i>	MK910227	PhoPeV
<i>Pestivirus N</i>	Tunisian sheep-like pestivirus	<i>Capra aegagrus hircus</i> , <i>Ovis gmelini aries</i>	ENMZ664273, AGMZ664274	TSV
<i>Pestivirus O</i>	Pestivirus ovino IT	<i>Ovis gmelini aries</i>	MK618725	ov IT PEV
<i>Pestivirus P</i>	Pestivirus del pangolin	<i>Amblyomma javanens</i> , <i>Manis javanica</i>	MK636874	DYPV
<i>Pestivirus Q</i>	Pestivirus de roedor	<i>Niviventer niviventer</i>	KY370101	RtNn-PeV
<i>Pestivirus R</i>	Pestivirus de roedor	<i>Apodemus peninsulae</i>	KY370100	RtAp-PeV
n.a.	Pestivirus de roedor	<i>Niviventer excelsior</i>	KY370099	RtNe-PeV
n.a.	Pestivirus de roedor	<i>Apodemus draco</i>	KY370102	RtAd-PeV
n.a.	Pestivirus de roedor	<i>Niviventer niviventer</i>	KY370103	RtNn-PeV
<i>Pestivirus S</i>	Pestivirus de murcielago	<i>Scotophilus khlii</i>	MH282908	BtSk-PeV

Cuadro 1.2 Especies de virus propuestos para el género *Pestivirus* (Modificado de Postel *et al.*, 2021)

1.2.1 Genotipos, subgenotipos y biotipos

Los VDVB son particularmente heterogéneos y se encuentran agrupados, como se mencionó anteriormente, en tres especies reconocidas hasta ahora, VDVB-1, VDVB-2, VDVB y HoBi-like o como *Pestivirus A*, B y H respectivamente (Cuadro 1.2). El impacto que tiene la heterogeneidad del VDVB se observa en la variedad de genotipos, subgenotipos, biotipos y virulencia entre cepas. Se ha descrito que la acumulación de mutaciones puntuales en el tiempo ha derivado en la segregación del VDVB en genotipos distintos (Ridpath *et al.*, 1994; Brownlie *et al.*, 2000).

Las diferencias entre los genomas del VDVB no solo se encuentran en una región en particular, sino que también pueden ser encontradas a lo largo de

todo el genoma (Bolin, 1995); por lo tanto, la relación que hay entre las secuencias de nucleótidos de las cepas es el criterio más fiable para su clasificación. Debido a lo anterior, la caracterización de los VDVB, así como de *Pestivirus* tentativos, se realiza mediante la comparación de secuencias nucleotídicas de regiones como la región no codificante 5'UTR y las regiones codificantes N^{pro} y E2 (Vilcek *et al.*, 2001).

Actualmente, la caracterización de recientes *Pestivirus* aislados ha llevado a la detección de virus atípicos relacionados filogenéticamente con el VDVB-1 y VDVB-2. Como consecuencia, algunos investigadores han propuesto que dichos virus conforman el genotipo 3 del VDVB (VDVB-3), también denominado como *HoBi-like*. Los miembros del VDVB-3 incluyen: el virus D32/00_”HoBi” aislado a partir de un lote de suero fetal bovino (SFB) originario de Brasil (Schirrmeyer *et al.*, 2004), el virus CHKaHo/cont detectado como un contaminante de cultivo celular en Suiza (Stalder *et al.*, 2005), SVA/cont08 detectado en un lote de SFB proveniente de Sudamérica (Liu *et al.*, 2009a), IZSPLV_To identificado en lotes de SFB y ganado bovino originario de Italia (Peletto *et al.*, 2010), Brz buf 9 detectado en un búfalo en Brasil (Stalder *et al.*, 2005), Th/04_KhonKaen recuperado del suero de un ternero infectado de manera natural (Liu *et al.*, 2009b), y la cepa Italy-1/10-1 asociado a un brote de enfermedad respiratoria grave en Italia (Decaro 2011).

Adicionalmente, los análisis filogenéticos del VDVB sugieren que existen subgrupos dentro de cada genotipo del VDVB. El VDVB-1 es particularmente diverso, con por lo menos 18 subgenotipos (VDVB-1a, VDVB-1b, VDVB-1c, VDVB-1d, VDVB-1e, VDVB-1f, VDVB-1g, VDVB-1h, VDVB-1i, VDVB-1j, VDVB-1k (Vilcek *et al.*, 2001) VDVB-1l (Kadir *et al.*, 2008; Jackova *et al.*, 2008), VDVB-1m (Xue *et al.*, 2010), VDVB-1n, VDVB-1o (Nagai *et al.*, 2008), VDVB-1p (Xue *et al.*, 2010), VDVB-1q (Gao *et al.*, 2013), VDVB-1r (Yesilbag *et al.*, 2014)). En contraste, el VDVB-2 se ha segregado en cuatro subgenotipos (VDVB-2a, VDVB-2b, VDVB-2c y VDVB-2d) (Flores *et al.*, 2002; Jenckel *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2015); y en el caso del VDVB-3, se han descrito cinco subgenotipos (VDVB-3a-VDVB-3e) (Giammarioli *et al.*, 2015; Kalaiyarasu *et al.*, 2021). Como se mencionó con anterioridad, la importancia

de la segregación en subgenotipos sigue siendo materia de discusión. Sin embargo, diversos estudios demuestran que la prevalencia de dichos subgenotipos es diferente por región geográfica, y que además existen variaciones antigénicas entre subgenotipos; las cuales han sido evidenciadas por las diferencias en ensayos de neutralización cruzada (Bachofen *et al.*, 2008), unión a anticuerpos monoclonales (Bolin y Ridpath, 1998) y respuesta a la vacunación en animales persistentemente infectados (Fulton *et al.*, 2003).

Para cada genotipo del VDVB existen dos biotipos, citopático (CP) y no citopático (NCP), y pueden variar de baja a alta virulencia. Esta clasificación se basa en su actividad en el cultivo celular, sin considerar la capacidad para producir enfermedad en el hospedador, es decir, la citopatogenicidad *in vitro* no está correlacionada con la virulencia *in vivo*. El biotipo CP, produce vacuolización citoplasmática y muerte celular (Rondón, 2006), mientras que el NCP se replica sin producir daño o modificación en la morfología celular (Thiel *et al.*, 1996; Lértora 2003). A nivel mundial, el NCP es el que está distribuido en mayor proporción en la población ganadera (Pellerin *et al.*, 1994), causando más del 90% de las infecciones (Dubovi, 1992), además de ser el único biotipo capaz de establecer persistencia en los animales, es decir, genera animales persistentemente infectados (PI) (Kirkland *et al.*, 1993; Baker 1995; Bolin y Ridpath 1992). Por el contrario, el virus CP se encuentra en la minoría de los casos y por lo general está asociado con brotes de la EM (Brownlie *et al.*, 1984).

1.3 Morfología

Los viriones del VDVB son esféricos, con un diámetro de 40-60 nm. Poseen una envoltura lipídica que contiene tres grupos de glicoproteínas denominadas E^{ms}, E1 y E2, las cuales recubren la cápside viral (Figura 1.1). Ésta última constituida por la proteína C, con un diámetro de 25 a 37 nm aproximadamente; sin embargo, su estructura y simetría no han sido del todo caracterizadas (Simmonds *et al.*, 2019).

1.4 Propiedades físico-químicas

El peso molecular del virión es de 6.0×10^7 y la densidad boyante en sacarosa es de 1.10-1.15 g/cm³. La infectividad del VDVB se mantiene estable en un amplio rango de pH; así mismo, la infectividad viral no se ve afectada a temperaturas de congelación, pero sí a temperaturas por arriba de los 40 °C. Los solventes orgánicos y detergentes pueden inactivar al VDVB, al igual que tratamientos con tripsina (0.5 mg/ml a 37°C por 60 min), etilenimina (10mmol/L a 37°C por 2 h), irradiación con haz de electrones (se requieren 4.9 y 2.5 kGy para reducir la infectividad viral 1 unidad en log₁₀ para muestras líquidas y congeladas, respectivamente) e irradiación gamma (20-30 kGy) (Ridpath, 2010).

1.5 Genoma viral

El genoma del VDVB es ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. Tiene una longitud de 12.3 kb aproximadamente, que codifica para un solo marco de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) (Simmonds *et al.*, 2019). El ORF está flanqueado por dos regiones no traducibles o UTR (*untranslated regions*) en el extremo 5' y 3' de 381-386 bases y 200-240 nucleótidos, respectivamente (Meyers y Thiel 1996; Collett *et al.*, 1988b). La región 5' UTR contiene el sitio de unión al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés), éste sustituye la función del cap para el inicio de la traducción (Poole *et al.*, 1995). La región 3' UTR no contiene cadena poliA, por el contrario, posee una cadena corta poliC (Mahy y Regenmortel, 2010).

El ORF es traducido en una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos, la cual se escinde co- y post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales en las proteínas virales individuales: N^{pro}-C-E^{rns}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B (Figura 1).

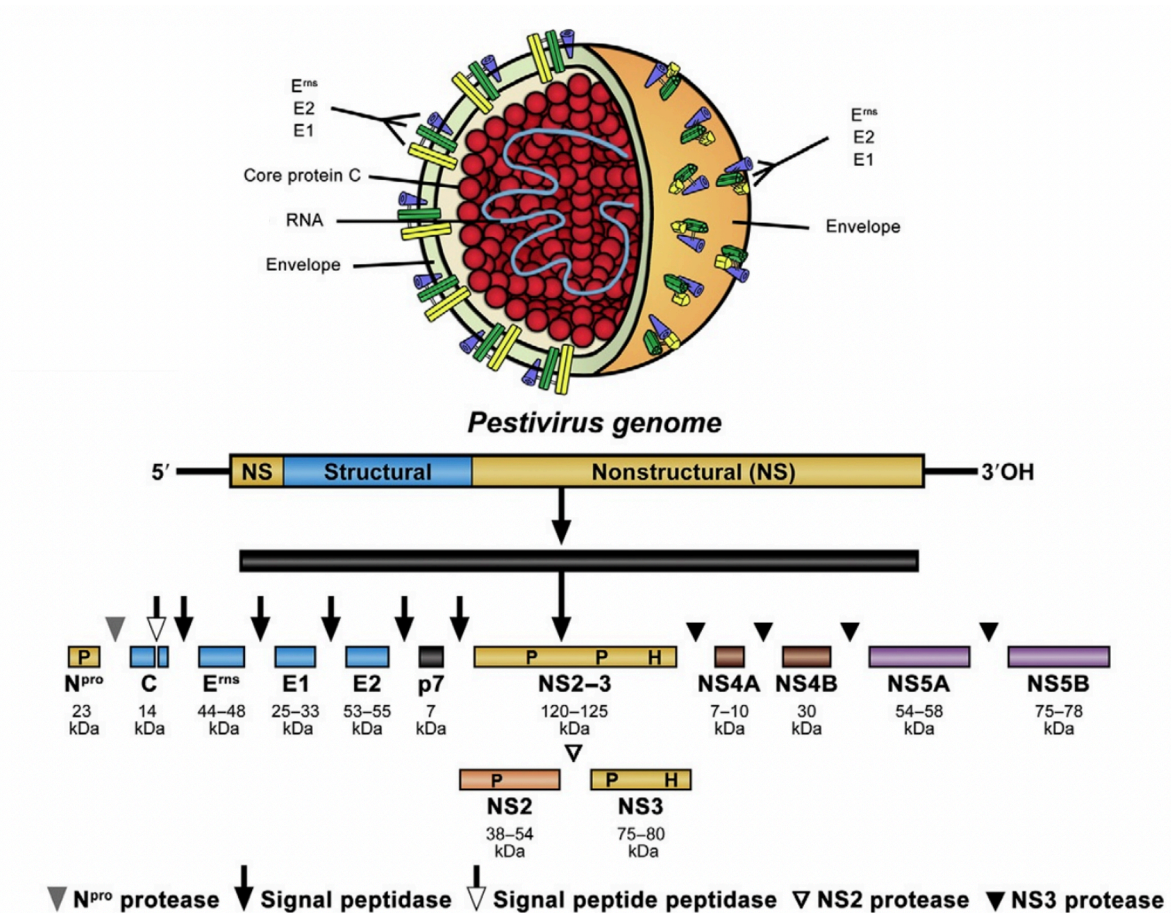


Figura 1.1 Morfología y organización del genoma del VDVB. La figura muestra la estructura de del VDVB. Debajo, representación esquemática del genoma viral y el procesamiento de la poliproteína en proteínas estructurales y no estructurales. Diseño Gráfico: Mandy Jörn, Friedrich-Loeffler-Institut.

Los viriones contienen cuatro proteínas estructurales: la proteína de la cápside C y tres glicoproteínas de envoltura E^{rns}, E1 y E2. Las proteínas restantes son no estructurales y asisten la escisión de la poliproteína e intervienen en la síntesis de cadenas positivas y negativas de ARN viral (Rümenapf *et al.*, 1993). En comparación con los otros géneros de la familia *Flaviviridae*, los *Pestivirus* codifican dos proteínas únicas N^{pro} y E^{rns} (Ridpath, 2010). Las funciones que tiene cada una de las proteínas virales se enlistan en el Cuadro 1.3.

1.6 Replicación viral

La replicación del VDVB comienza con la unión del virus a las células del hospedador, proceso que involucra a las glicoproteínas virales E^{rns}, E1 y E2 (Liang *et al.*, 2003). La proteína E^{rns} es la primera proteína en interactuar con los glicosaminoglucanos de la superficie celular (Iqbal *et al.*, 2000), mientras que E2 lo hace con proteínas de la membrana celular (Xue *et al.*, 1993), como el CD46 (Maurer *et al.*, 2004) y LDLr (*low-density lipoprotein receptor*) (Agnello *et al.*, 1999). Una vez que el virus establece interacción con los receptores, ingresa a la célula por medio de endocitosis mediada por clatrina. La membrana de la vesícula endocítica se fusiona con la envoltura viral, en un proceso de fusión inducido por la disminución del pH endosomal y mediado por glicoproteínas virales (Lecot *et al.*, 2005). Después de dicho evento, se lleva a cabo el proceso de desnudamiento, el cual ocurre cuando la cápside es removida por medio de enzimas celulares y el material genético del virus es liberado en el citoplasma (Sagar *et al.*, 2008). Una vez que el ARN viral es liberado en el citoplasma, puede ser traducido sin transcripción previa, es decir, actúa como un ARN mensajero. La traducción es independiente de cap-5' y se inicia por el IRES (tipo IV) localizado en la región 5'UTR. El IRES se encarga de mediar la correcta unión del codón de inicio con el ribosoma (Pestova y Hellen 1999).

Como resultado de la traducción del mensajero se genera una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos que es procesada y escindida, co y post traduccionalmente para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus, este proceso es resultado de la actividad de proteasas tanto celulares como virales.

Cuadro 1.3			
Proteínas del VDVB			
Proteína	Tamaño (kDa)	Función	Características
N ^{pro}	20	Autoproteasa	Única en el género <i>Pestivirus</i>
		Bloquea la actividad reguladora del factor regulador de interferón 3 (IRF-3)	Proteína de 168 aminoácidos Primera en ser liberada de la poliproteína
		Impide la producción de interferón tipo I	
C	14	Forma la cápside del virión	Proteína de 120 aminoácidos
		Tiene un papel importante en el empaquetamiento y morfogénesis del virión	
E ^{ms}	44-48	Proteína integral de membrana	Única en el género <i>Pestivirus</i>
		Actividad de ribonucleasa	Glicosilada
		Establece el primer contacto con la célula por medio de glicosaminoglicanos, aunque no es fundamental para la entrada a la célula	Forma homodímeros unidos por puentes disulfuro
		Induce la producción de anticuerpos con actividad neutralizante débil	Carece de dominio transmembranal
		Previene la inducción del interferón β	
E1	33	Proteína integral de membrana	Glicosilada
		Forma heterodímeros con E2 unidos por puentes disulfuro	Proteína de 195 aminoácidos
E2	55	Principal proteína integral de membrana	Glicosilada
		Forma homodímeros y heterodímeros con E1 unidos por puentes disulfuro	Proteína de 375-400 aminoácidos
		Tiene mayor capacidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes	Posee epítomos neutralizantes e inmunodominantes
		Esencial para la infectividad del virus	El gen que codifica para esta proteína tiene una región variable altamente mutable
p7	7	Necesaria para la maduración del virión Posible papel en el ensamblaje del virus	Se requiere para la producción de virus infecciosos
NS2/3	125	La porción amino terminal (NS2) es una proteasa, responsable del procesamiento de NS2/3	Proteína multifuncional de 1300 aminoácidos. Formada por la unión de las proteínas NS2 y NS3
		NS3 actúa como proteasa y como ARN helicasa/ATPasa	Su escisión determina el biotipo viral
		Participa en el ensamblaje y producción de partículas virales infecciosas	NS2/3 es considerada una proteína marcadora del VDVB no citopático
		NS3 es responsable de la escisión entre NS3 y NS4A, NS4A y NS4B, NS4B y NS5A, y NS5A y NS5B	NS3 es considerada una proteína marcadora del VDVB citopático
NS4A	7	Actúa como un cofactor de la actividad de la proteasa NS3	Proteína de 64 aminoácidos Hidrofóbica
NS4B	33	Participa en la citopatogenicidad viral Forma parte del complejo de replicación	Hidrofóbica
NS5A	58	Asociada a cinasas celulares Forma parte del complejo de replicación	Fosforilada
NS5B	75-81	Necesaria para el ensamblaje y la liberación de las partículas virales de la célula hospedadora Posee actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN	Contiene la secuencia GDD (Gly-Asp-Asp) común en todas las polimerasas

Cuadro 1.3 Características de las proteínas del VDVB.

N^{pro} es la primera proteína en ser liberada de la poliproteína debido a su función de autoproteasa, por medio de su propia escisión en la región N^{pro}/C. Es una proteína no estructural con función de proteasa, la cual bloquea la función del IFN-1 al reducir el nivel intracelular del factor 3 regulador de interferón (IRF-3) por degradación proteolítica por la ruta proteasomal (Bauhofer *et al.*, 2007). Las escisiones río abajo que generan a las proteínas C, E^{ms}, E1, E2 y p7 se llevan a cabo por medio de las enzimas celulares: peptidasas peptídicas de señal y la peptidasa señal (Elbers *et al.*, 1996; Heimann *et al.*, 2006). La proteína C forma la cápside del virión y empaqueta el ARN viral; su extremo N-terminal es generado por una peptidasa señal celular.

La glicoproteína E^{ms} es una proteína única del género *Pestivirus* con función de RNasa y se ha demostrado que es capaz de suprimir la inducción del IFN- β así como de la proteína MxA inducida por interferón (Mätzener *et al.*, 2009). La proteína E1 de superficie aún no ha sido caracterizada en su totalidad; sin embargo, se ha descrito que forma heterodímeros con la proteína E2 y adicionalmente los animales infectados de manera natural con el VDVB no desarrollan anticuerpos contra la proteína E1 (Thiel *et al.*, 1991). E2 es la glicoproteína que se une al receptor de las células del hospedador, es responsable del tropismo celular, posee el principal epítoto neutralizante e inmunodominante, es decir, tiene la mayor capacidad de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes (Donis *et al.*, 1988). La translocación de todas las glicoproteínas al retículo endoplásmico se realiza debido a la secuencia señal interna (Elbers *et al.*, 1996).

La proteína no estructural p7 se requiere para la producción de virus infecciosos (Harada *et al.*, 2000), y su porción carboxilo terminal funciona como una secuencia señal para la translocación de la proteína NS2 a la membrana (Agapov *et al.*, 2004). Adicionalmente, debido a algunas de sus características como el ser hidrofóbica, ser una proteína integral de membrana con una región central cargada sugiere que podría tener función de vioporina, y por lo tanto, funciona como un canal de iones (Largo *et al.*, 2014).

NS2-3 es una proteína multifuncional formada por la unión de las proteínas NS2 y NS3 y su escisión determina el biotipo del VDVB y así, su citopatogenicidad en cultivo celular; se puede encontrar NS2/3 (NCP) o NS2 y NS3 (CP), la presencia incrementada de NS3 en el biotipo CP, es debido a eventos mutacionales como la recombinación o inserción de genes u otros mecanismos como deleciones, duplicaciones de genes o rearrreglos genéticos (Becker, 2000; Meyers *et al.*, 1992; Lambot *et al.*, 1997). Los 146 aminoácidos en la región C-terminal del dedo de zinc forman un dominio con actividad de serina proteasa responsable por los procesos de escisión río abajo de NS3; éste proceso es facilitado por el cofactor NS4A en los sitios NS4B/5A y NS5A/B (Tautz *et al.*, 1997). El siguiente par de dominios tienen actividad de ATPasa y helicasa necesarios para la replicación del ARN (Andrew *et al.*, 2012). Adicionalmente, la proteína NS2-3 participa en el ensamblaje de partículas virales y es requerida para la producción de partículas virales infecciosas (Agapov *et al.*, 2004).

Aún no se conoce todo sobre la replicación del VDVB; sin embargo, se piensa que se lleva a cabo en asociación con membranas intracitoplasmáticas por medio de un complejo de replicación conformado por el ARN viral y las proteínas no estructurales. Durante este proceso, se realiza la síntesis de la cadena de ARN negativa que sirve como molde para la síntesis de la cadena de ARN positiva. Se han detectado cadenas de polaridad positiva y negativa desde las 4 a 6 horas post infección, a partir de este momento la tasa de síntesis de ARN de cadenas positivas se incrementa rápidamente, mientras que la síntesis de ARN de cadenas negativas permanece constante. La proporción de cadenas de ARN positivo-negativo, en células 12 h post infección es de 10:1 (Murphy *et al.*, 1999; Tautz *et al.*, 2015).

La proteína NS4A actúa como cofactor de la actividad de proteasa de la NS2-3 y desempeña un papel crítico en la morfogénesis de los viriones del VDVB (Liang *et al.*, 2009). NS4B y NS5A forman parte del complejo de replicación, aunque su función exacta aún no es descrita de manera precisa. La NS5B tiene función de RNA polimerasa dependiente de ARN esencial para la replicación viral (Lai *et al.*, 1999)

El ensamblaje de partículas virales se realiza en el retículo endoplásmico (Grummer *et al.*, 2001), su envoltura es adquirida a partir de las membranas intracelulares de vesículas citoplasmáticas y aparato de Golgi; finalmente, las partículas virales son transportadas por medio de la vía secretoria y liberadas por exocitosis (Sagar *et al.*, 2008).

1.7 Patogenia y patogénesis de la DVB

El hospedador principal del VDVB son los bovinos, que constituyen la principal fuente de infección y reservorio del virus. Sin embargo, al ser un *Pestivirus* tiene la capacidad de cruzar la barrera de especie infectando naturalmente a los ungulados del orden *Artiodactyla*, es decir, porcinos, ovinos, caprinos, alpacas, llamas, camellos, búfalos de agua, antílopes y venados (Peterhans *et al.*, 2010; Nettleton 1995).

El VDVB puede ser transmitido por vía horizontal y vertical. Siendo los animales PI, los que cursan un proceso agudo de la infección, las principales fuentes de infección. La principal ruta de transmisión horizontal es el contacto directo de animales susceptibles con secreciones de animales infectados, como la orina, heces, descargas nasales, saliva, semen, leche y demás fluidos corporales (Bruschke *et al.*, 1998); también, se puede transmitir de forma indirecta por medio del uso de material contaminado como guantes de palpación rectal (Lang-Ree *et al.*, 1994), agujas, pinzas de nariz (Gunn, 1993) y el uso de vacunas contaminadas con el VDVB (Loken *et al.*, 1991; Barkema *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 2003; Pastoret 2010; Falcone 1999).

El VDVB tiene la capacidad de cruzar la barrera placentaria e infectar al feto. En éste, el desarrollo de la infección depende de la etapa de gestación en la cual la hembra es infectada, así como el biotipo viral. En el caso de animales PI se considera que siempre tendrán terneros PI (Moennig y Leiss, 1995) y en animales que cursan una infección aguda la probabilidad de una transmisión vertical es mayor que la horizontal (Lindberg y Houe, 2005). El periodo de incubación del VDVB de 3-7 días y los animales pueden permanecer virémicos de 4-15 días después de la infección inicial (Brownlie, 2005).

La ruta de entrada más frecuente del VDVB es por la mucosa nasal o bucal, después del contacto directo con las secreciones de animales infectados la replicación viral ocurre en células epiteliales y en tonsilas palatinas de donde los linfocitos propagan el virus a diversos tejidos y órganos (Bruschke *et al.*, 1998a; Bruschke *et al.*, 1998b).

Se ha demostrado que las cepas de baja virulencia se replican en tonsilas palatinas, linfonodos regionales, placas de Peyer, timo, bazo y mucosa intestinal (Liebler-Tenorio, 2003); mientras que las cepas de alta virulencia se replican en los órganos previamente mencionados y además en mucosa de tracto digestivo alto y bajo, tracto respiratorio, médula ósea (infectando células mieloides como megacariocitos) y piel (Liebler-Tenorio, 2005).

Factores como el genotipo, biotipo y virulencia de cada una de las cepas virales; así como la edad, estado fisiológico y el estado inmunológico del hospedador determinarán el tipo de presentación de la DVB. La patogénesis de la DVB es una compleja combinación de presentaciones clínicas que incluyen dos estados de infección: aguda y persistente; de las cuales se derivan 5 manifestaciones clínicas agudas y una que resulta de la infección persistente (Figura 1.2):

- Infección subclínica. En la mayoría de los casos las infecciones en bovinos susceptibles no gestantes son subclínicas, pero dependiendo de la cepa y genotipo pueden llegar a causar la enfermedad (Pellerin *et al.*, 1994). Los animales infectados se caracterizan por tener hipertermia leve y leucopenia (Baker 1987) .
- Infección aguda. Se desarrolla en bovinos susceptibles (seronegativos), inmunocompetentes (Sagar *et al.*, 2008), en particular en animales de 6 a 24 meses de edad (Ramírez *et al.*, 1999) y es causada en su mayoría por el VDVB NCP (Baker, 1995). Se caracteriza por pirexia, leucopenia 3-7 días post-infección, diarrea, depresión, inapetencia, descargas oculares y nasales, erosiones en mucosa oral, y en el caso de vacas lecheras disminuye la producción láctea.

- Síndrome hemorrágico. Este cuadro está asociado al VDVB 2 biotipo NCP (Brownlie *et al.*, 2000; Ridpath *et al.*, 2006), se caracteriza por mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimóticas, hipertermia, hemorragia en múltiples sistemas orgánicos, diarrea sanguinolenta, epistaxis, sangrado constante en sitios de inyección, anemia, leucopenia, trombocitopenia y muerte (Bolin y Ridpath 1992; Ridpath *et al.*, 2000).
- Inmunosupresión. El VDVB tiene tropismo por células del sistema inmunológico como neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B y células presentadoras de antígenos (CPA) (Sopp, *et al.*, 1994), principalmente monocitos, macrófagos y células dendríticas, causando inmunosupresión e incrementando la susceptibilidad a infecciones secundarias por patógenos oportunistas. Los animales infectados disminuyen la respuesta contra el VDVB y otros agentes. El VDVB juega un papel importante en enfermedades de etiología múltiple, un ejemplo de ello es el complejo respiratorio bovino (CRB) (Fulton *et al.*, 2000).
- Enfermedad respiratoria bovina. Debido a la inmunosupresión causada por el VDVB, este ha sido aislado frecuentemente a partir de ganado con neumonía y comúnmente se presenta en infecciones con otros agentes como herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) (Biuk-Rudan, *et al.*, 1999), virus de parainfluenza-3 (PI3) (Fulton *et al.*, 2000), coronavirus bovino (VCoB), virus sincitial respiratorio bovino (VSRB) (Brodersen y Kelling, 1999), *Manhemia haemolytica*, *Pasteurella multocida* (Martin *et al.*, 1990) y *Mycoplasma bovis* (Haines *et al.*, 2001). Adicionalmente, se ha descrito que el VDVB puede presentar sinergismo en la infección con el HVB-1 y VSRB causando problemas respiratorios (Potgieter *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1999).
- Infección de animales gestantes. La infección congénita resulta en una amplia gama de anomalías como reabsorción embrionaria, aborto, momificación, malformaciones congénitas, nacimiento de terneros débiles, de bajo peso y tamaño y nacimiento de animales persistentemente infectados o PI (Radostits y Littlejohns, 1988). Ambos biotipos tienen la capacidad de cruzar barrera placentaria,

pero únicamente el NCP es capaz de producir una infección persistente en el feto. Si se adquiere una infección por el VDVB-NCP entre los días 40 y 125 de gestación, antes de que ocurra el proceso de reconocimiento entre lo propio y lo no propio, se produce una infección asintomática al establecerse una tolerancia hacia el VDVB (Kirkland *et al.*, 1993; Fetzer *et al.*, 2005). Estos animales, denominados PI's son virémicos e incapaces de sintetizar anticuerpos o activar linfocitos T contra el VDVB que les produjo la tolerancia (Tews *et al.*, 2009).

- Enfermedad de las mucosas (EM). Esta condición, solo ocurre en animales PI, los cuales pueden desarrollar la enfermedad como resultado de una sobreinfección con un VDVB CP homólogo (Brownlie *et al.*, 2000) o heterólogo (Ridpath *et al.*, 1991) de origen exógeno o generada a partir de cambios genéticos o recombinación del ARN de las cepas NCP residentes (Vera *et al.*, 1999).

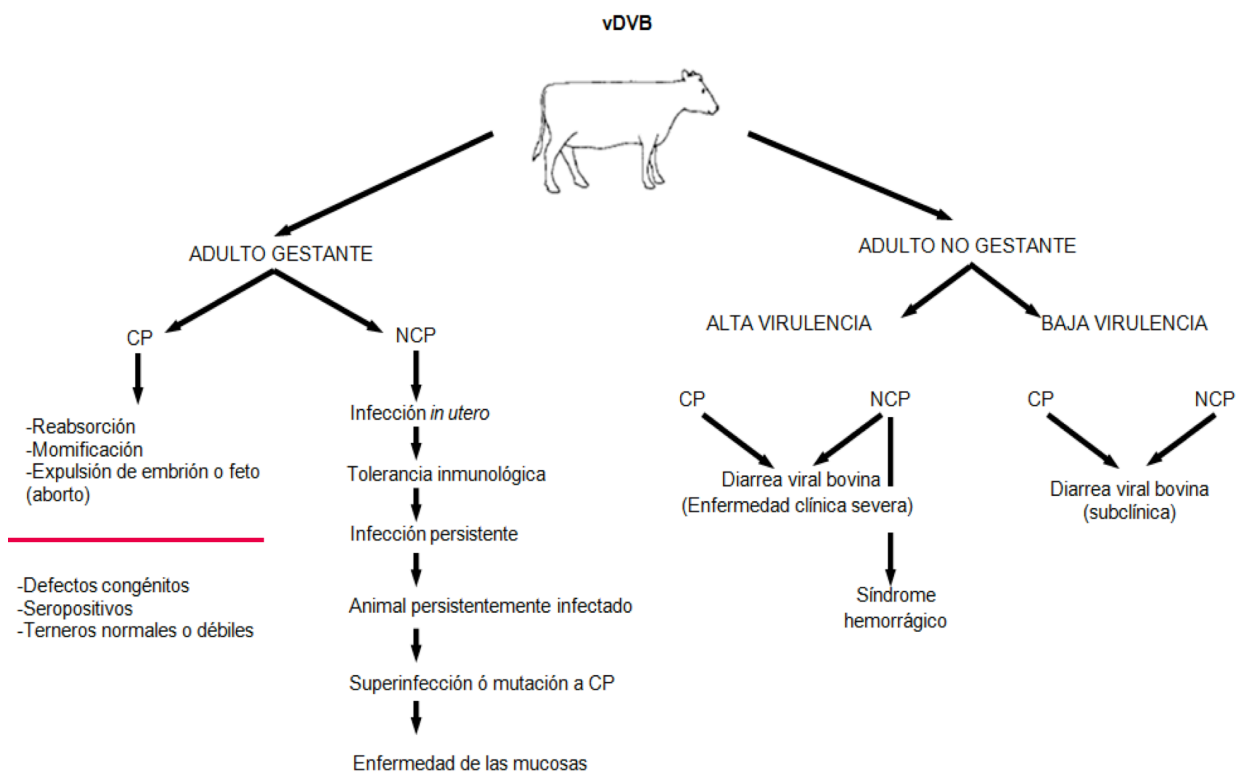


Figura 1.2 Manifestaciones clínicas causadas por la infección con el VDVB.

1.7.1 Contaminación por el VDVB

Como consecuencia de la patogenia de la DVB, la combinación de altas concentraciones de VDVB en el suero de animales PI y la alta prevalencia de las infecciones persistentes en animales gestantes, son los principales responsables de la presencia de diversos linajes del VDVB en el suero de terneros. Por lo general, el SFB que se distribuye comercialmente, se obtiene a partir de una mezcla de sueros obtenidos de 4000 fetos aproximadamente; por lo tanto, diferentes cepas del VDVB pueden contaminar el suero. La capacidad que tienen los VDVB de propagación trasplacentaria representa un riesgo potencial cuando productos derivados de los bovinos son utilizados en la elaboración de inmunógenos (Pastoret, 2010).

El SFB es uno de los factores de crecimiento más empleado en la propagación y mantenimiento de cultivos celulares utilizados en la producción de vacunas y a nivel de investigación. Debido a lo anterior, es común encontrar al VDVB como contaminante en más del 50% los sueros comercializados (Monteiro *et al.*, 2018; Zabal *et al.*, 2000) así como en vacunas de uso humano y veterinario (Pastoret, 2010); en este contexto, aunque se desconoce el impacto que el VDVB tiene en la salud humana, es importante considerar técnicas adecuadas para el control de calidad de dichos productos. Así mismo, las infecciones iatrogénicas por el VDVB generadas por la aplicación de vacunas contaminadas se ha descrito con anterioridad en bovinos y cerdos, en donde como consecuencia se reportaron brotes de la DVB en dichas especies (Barkema *et al.*, 2001; Falcone *et al.*, 1999; Falcone *et al.*, 2003; Pastoret *et al.*, 1997). Aunado a lo anterior, se han detectado líneas celulares de origen bovino, ovino, caprino, de ciervo, bisonte, hámster, conejo, mono, gato doméstico obtenidas del ATCC (*American Type Culture Collection*) contaminadas con el VDVB (Bolin *et al.*, 1994).

Es importante resaltar que los virus D32/00_”HoBi”, SVA/cont08, IZSPLV_To (Schirrmeier *et al.*, 2004, Stalder *et al.*, 2005, Peletto *et al.*, 2010) fueron aislados a partir de lotes SFB y el virus CHKaHo/cont fue detectado como un contaminante de cultivo celular (Stalder *et al.*, 2005); lo anterior, ha tenido una implicación a nivel de salud

animal, ya que cepas genéticamente relacionadas han sido identificadas a nivel de campo ocasionando diversos cuadros patológicos, que a su vez, se traduce en grandes pérdidas económicas (Weber *et al.*, 2017).

La problemática antes planteada junto con el creciente reporte de virus contaminantes de productos utilizados para el control de enfermedades en animales resalta la importancia del desarrollo de inmunógenos eficaces y seguros como una herramienta para evitar la diseminación del VDVB, evitar que se generen infecciones placentarias y así promover el control de la DVB.

1.8 Situación actual de la DVB

La DVB es una enfermedad endémica de las poblaciones ganaderas, en donde el VDVB-1 está distribuido mundialmente (Houe, 1995), el VDVB-2 sólo se ha detectado en Estados Unidos, Canadá y en algunos países de Europa y África, mientras que vDVB-3 o *HoBi-like* se ha detectado únicamente en países como Brasil, Australia, Canadá, Estados Unidos (Xia *et al.*, 2011) Italia, Suiza, India (Mishra *et al.*, 2014) y Bangladesh (Haider *et al.*, 2014). Así mismo, se ha descrito una prevalencia de infección por el VDVB a nivel mundial en donde del 1-2% corresponde a animales PI, y una seroprevalencia del 60-85% en la población bovina (Houe, 1999).

Como se mencionó con anterioridad, la prevalencia de genotipos y subgenotipos puede variar de una región a otra; por lo tanto, la prevalencia y distribución de los VDVB en cada país pueden ser diferentes. Estas diferencias están relacionadas a diversos factores como la densidad de población, tipo de explotación, vacunación, comercio de animales, manejo del ganado, manejo de pasturas entre otros.

La DVB está enlistada por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) como una enfermedad de notificación obligatoria (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2008) y en nuestro país es reconocida por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) como una enfermedad endémica y de notificación obligatoria con base en el *Acuerdo mediante el cual se enlistan las*

enfermedades y plagas de los animales, endémicas y exóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos.

En México, los estudios realizados en algunas regiones han determinado una seroprevalencia que va del 12% al 75% (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007; Saldívar *et al.*, 2009; Suzan *et al.*, 1983; Correa *et al.*, 1974). Recientemente, se determinó que los subgenotipos que circulan en el ganado mexicano son VDVB-1a, 1b, 1c y 2a; sin tener evidencia de la presencia del VDVB-3 en los animales analizados (Gómez-Romero *et al.*, 2017).

La DVB genera un impacto económico significativo a la industria ganadera, atribuido a la pérdida de la producción láctea, disminución en el rendimiento reproductivo, retraso en el crecimiento, defectos congénitos, incremento en la predisposición a enfermedades concomitantes e incremento de la mortalidad en animales jóvenes (Houe, 2003). Las disfunciones reproductivas generadas por la infección con el VDVB representan la causa principal de las pérdidas económicas, debido a los abortos, disminución en la tasa de concepción y nacimiento de animales débiles. Es por esto que la DVB sigue siendo considerada como una de las enfermedades virales económicamente importantes que afectan al ganado bovino. Las pérdidas económicas asociadas a la infección por el VDVB se estiman en 46 millones de dólares por millón de partos (Bennett *et al.*, 1999; Heuer *et al.*, 2007; Houe, 2003).

Debido a esta situación, en diversos países de Europa se han aplicado, de manera exitosa, programas de erradicación que ofrecen un enfoque alternativo para el control de la DVB a nivel granja (Lindberg *et al.*, 2006); aunque para el establecimiento de medidas de control se requiere de una aportación financiera extra, todas las opciones para el control de la enfermedad son económicamente favorables en comparación con el costo de una infección por el VDVB (Reichel *et al.*, 2008).

1.9 Control

Debido a la compleja patogénesis de la DVB, el control de la enfermedad es complicado. El objetivo de utilizar un programa de control es minimizar las pérdidas económicas al reducir la incidencia de animales infectados con VDVB y con esto su diseminación (Laureyns *et al.*, 2010). Algunos países implementan la erradicación de la DVB por medio de programas de control con vacunación (Houe, 2006; Lindberg y Alenius, 1999).

La vacunación representa una estrategia eficaz para prevenir el desarrollo de la enfermedad y su vez la infección transplacentaria. Al ser una herramienta utilizada ampliamente en el mundo, es posible encontrar en el mercado nacional e internacional vacunas de virus activo atenuadas e inactivado. Sin embargo, una desventaja al utilizar vacunas atenuadas es que se desconocen las bases genéticas de la atenuación, lo cual implica un riesgo impredecible de reversión a la virulencia (Leifer *et al.*, 2013). Por otra parte, un riesgo latente en el uso de este tipo de vacunas son los problemas que pueden causar en animales gestantes, tales como daños al feto, aborto o infección persistente (Becher *et al.*, 2001). Además la administración de vacunas activas puede desencadenar EM, cuando se desconoce la presencia de PI's en el hato, inmunosupresión e incluso la enfermedad similar a la que se genera por una infección de campo (Thierauf *et al.*, 1993).

En el caso de las vacunas inactivadas, la principal desventaja que tienen es que no inducen una respuesta inmune celular debido a la ausencia de síntesis *de novo* de proteínas virales que puedan presentarse mediante el complejo principal de histocompatibilidad. Además, tienen una limitante a nivel industrial relacionada con la obtención de suficiente antígeno viral para inducir una respuesta inmune protectora. Se considera que este tipo de vacunas son seguras; sin embargo, se ha reportado, en diversos países de Europa, el surgimiento de una enfermedad fatal denominada pancitopenia neonatal; la cual esta asociada al uso de vacunas inactivadas contra el VDVB (Bastian *et al.*, 2011).

En México, se comercializan vacunas activas e inactivadas que contienen cepas de VDVB-1a, recientemente 1b y 2a. Por lo general, se combinan con otros antígenos virales como HVB-1, PI-3, vSRB; así como algunos antígenos bacterianos (*Leptospira canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. Pomona*, *Haemophilus somnus*, y *Pasteurella (Manhemia) haemolytica A*). Sin embargo, no incluyen todos los subgenotipos o cepas que circulan en la población ganadera; se recomienda que dichos subgenotipos sean incluidos en las vacunas para mejorar la eficacia de las mismas (Ridpath, 2010). Debido a lo anterior, es necesario el desarrollo de inmunógenos que ofrezcan mayores ventajas que las vacunas comerciales tradicionales, como la inducción de una adecuada respuesta inmune protectora y proteger al feto de infecciones *in utero*. Una de las estrategias más exitosas utilizadas actualmente, se basa en el uso de antígenos que induzcan una respuesta inmunológica protectora (Taken y Figdor 2011).

La glicoproteína E2, es considerada como la principal proteína estructural inmunodominante del VDVB, debido a que posee los principales epítopes neutralizantes, es decir, tiene mayor capacidad de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes necesarios para el control de la enfermedad. Dichos anticuerpos, interfieren con la unión del VDVB con el receptor de su célula blanco previniendo la infección (Donis *et al.*, 1988). Incluso los anticuerpos protectores inducidos por la vacunación, así como por la infección natural con cepas de vDVB, son predominantemente anti-E2 (Ridpath, 2010). La glicoproteína E2 integral de membrana está codificada por el gen gp53, el cual contiene una región hipervariable y altamente mutable; por consiguiente, es el sitio en donde ocurren las mutaciones que generan cambios antigénicos que dan lugar a la generación de diversas cepas del VDVB (Xue *et al.*, 2010); asimismo, E2 es indispensable para la infectividad del virus, al igual que para determinar el tropismo del VDVB en cultivos celulares (Liang *et al.*, 2003). Adicionalmente, la secuencia del gen es ampliamente utilizada para realizar la clasificación de aislamientos del VDVB (Becher *et al.*, 1999).

Los esfuerzos por generar vacunas seguras y eficaces contra el VDVB, han

llevado a utilizar como inmunógeno productos derivados de la biotecnología, como las proteínas recombinantes. La proteína recombinante E2 representa un candidato ideal para su uso tanto en diagnóstico como en vacunación. Por ejemplo, grupos de investigación han estandarizado pruebas de ELISA utilizando la proteína E2 (Behera *et al.*, 2015); así como también existen de manera comercial (Lawrence y McClure, 2007). En el caso de la vacunación, se ha utilizado dicha proteína para el desarrollo de inmunógenos como vacunas de ADN (Nobiron *et al.*, 2003), de subunidades (Bruschke *et al.*, 1997) y recombinantes (Loy *et al.*, 2013) que aún están en etapa de experimentación y evaluación para ser utilizados en programas de control de la DVB. Estudios en donde se utiliza la proteína E2 recombinante en ensayos de inmunización, han tenido resultados promisorios en cuestión de protección contra el VDVB, disminución de signos, como la leucopenia, y reducción en la presentación de la DVB en bovinos (Loy *et al.*, 2013; Chimeno *et al.*, 2007). El uso de la proteína inmunodominante, puede representar una herramienta útil para el desarrollo de estrategias eficientes para controlar al VDVB.

2. Justificación

En México, el control de la DVB se lleva a cabo a través del uso de vacunas de virus atenuados e inactivados; sin embargo, las cepas vacunales incluidas en dichos inmunógenos incluyen cepas originarias de otros países, sin incluir los VDVB detectados en poblaciones ganaderas de nuestro país. Además, debido a la capacidad del VDVB de cruzar barrera placentaria, el uso de vacunas de virus atenuado representa un riesgo en hembras gestantes, así como en la producción de inmunógenos contaminados con este virus.

Esta problemática hace necesario el desarrollo de inmunógenos seguros y eficaces, como antígenos recombinantes, que confieran niveles de protección tanto a ganado gestante como a sus productos.

2. Hipótesis

La proteína E2 recombinante del subgenotipo VDVB-1a será capaz de inducir una respuesta inmune protectora en ratones vacunados al ser desafiados con una cepa del VDVB.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Producir la proteína E2 del virus de la diarrea viral bovina subgenotipo 1a (VDVB-1a) por métodos recombinantes en bacterias y en células de mamífero, para evaluar su inmunogenicidad en un modelo murino con la finalidad de determinar la protección conferida en dicho modelo.

4.2 Objetivos específicos

- Construir plásmidos que permitan la expresión de la proteína recombinante E2 del VDVB-1a en bacterias y en células eucariontes y purificar de la proteína sintetizada.
- Inmunizar ratones Balb/c con la proteína recombinante E2 del VDVB-1a sintetizada en bacterias y en células eucariontes.
- Determinar el título de anticuerpos neutralizantes inducidos contra el VDVB en el suero de los ratones inmunizados.
- Evaluar el nivel de protección conferido por la proteína E2 recombinante al ser desafiados con el VDVB, en el modelo de ratón.

5. Material y métodos

5.1 Cepa de referencia y mantenimiento

Se utilizó la cepa de referencia del VDVB NADL (*National Animal Disease Laboratory*), la cual se replicó en la línea celular MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*). Brevemente, se realizó la infección de monoestratos de células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) sin medio de crecimiento contenidas en una botella de 75 cm² con un 80% de confluencia. Una vez inoculado el monoestrato, se incubó a temperatura ambiente en agitación por una hora; transcurrido el tiempo de incubación se decantó el inóculo y se adicionó 15 ml de medio fresco MEM (*Minimun Esential Medium Eagle*)¹ suplementado con 10% de suero equino².

Posterior a la infección, las botellas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ por 72 h, momento en el que se observó efecto citopático. Después se realizó lisis celular por congelación a -80°C y posterior descongelación. Una vez realizado lo anterior, el cultivo lisado fue centrifugado a 3000 rpm por 5 min para retirar detritus celulares. Se cosechó el virus contenido en el sobrenadante para hacer alícuotas de 1.5 ml del mismo y se conservaron a -80°C hasta su uso.

5.2 Amplificación de fragmento del gen E2

5.2.1 Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total a partir de 300 µl de la cepa del VDVB-1a NADL utilizando Trizol® Reagent, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La elución del ARN se realizó en un volumen de 20 µl y fue almacenado a -80°C hasta su uso.

¹ MEM Thermo Fisher Scientific 61100061

² Horse Serum ATCC® 302040

5.2.2 RT-PCR

Se utilizaron 500 ng de RNA de la cepa de referencia NADL para la síntesis de cDNA. Para la RT-PCR se utilizaron dos juegos de iniciadores, los cuales se enlistan en los cuadros 5.1 y 5.2. De los iniciadores E2p, el iniciador *forward* contiene la secuencia CACC en el extremo 5' y el iniciador *reverse* contiene un codón de paro en el extremo 3' necesarios para poderse clonar en el vector pET100/D-TOPO.

Iniciador	Sentido	Secuencia	Tamaño del producto	Autor
E2p	<i>Forward</i>	CACCATGCACTTGGATTGCAAACCTGAATTC	1030pb	Este trabajo
	<i>Reverse</i>	TTAGGACTCAGCGAAGTAATCCCGGT		

Cuadro 5.1 Iniciadores utilizados para amplificar el gen E2 del VDVB.

De los iniciadores E2e, el iniciador *forward* contiene el sitio de restricción para la enzima *HindIII* (subrayado) en el extremo 5' y el iniciador *reverse* contiene el sitio de restricción para la enzima *XhoI* (subrayado) en el extremo 3'.

Iniciador	Sentido	Secuencia	Tamaño del producto	Autor
E2e	<i>Forward</i>	<u>CCCGAAGCTT</u> GCACTTGGATTGCAAACCTGAATTC	1031 pb	Donofrio <i>et al.</i> , 2006
	<i>Reverse</i>	CCCCG <u>CTCGAGT</u> GGAAGTAATCCCG		

Cuadro 5.2 Iniciadores utilizados para amplificar el gen E2 del VDVB.

Para la reacción de RT-PCR se utilizaron los siguientes reactivos:

RT		
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Iniciador 3'	10µM	1µM
DNTP's	10mM	200µM
RNA		500ng
Inhibidor RNAsas	40U/µl	20U/µl
DTT	0.1M	10µM
Buffer <i>First Strand</i>	5x	1x
MMLV	200U/µl	200U
Agua		c.b.p. 20µl
Volumen Final		20µl

Cuadro 5.3 Reactivos y concentraciones utilizados para la RT.

PCR		
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
PCR Buffer	10x	1x
MgCl ₂	50mM	1.5μM
DNTp's	10mM	200μM
Iniciador 5'	10μM	1μM
Iniciador 3'	10μM	1μM
Taq	5U/μl	1U
cDNA		500ng
Agua		c.b.p 25μl
Volumen Final		25μl

Cuadro 5.4 Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR.

Una vez realizadas las mezclas de reacción, se llevó a cabo la PCR utilizando las siguientes condiciones:

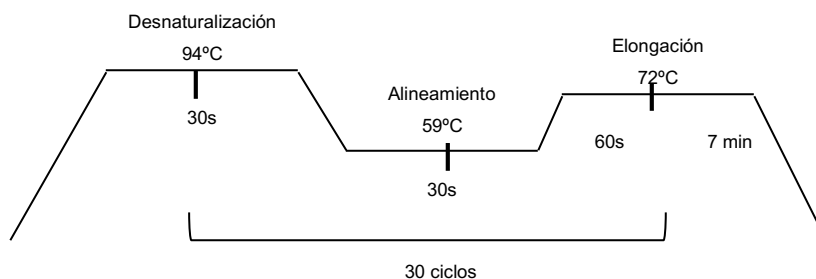


Figura 5.1 Condiciones de la RT-PCR para primers E2e. Condiciones de temperatura y ciclos en la RT-PCR establecidas en el termociclador.

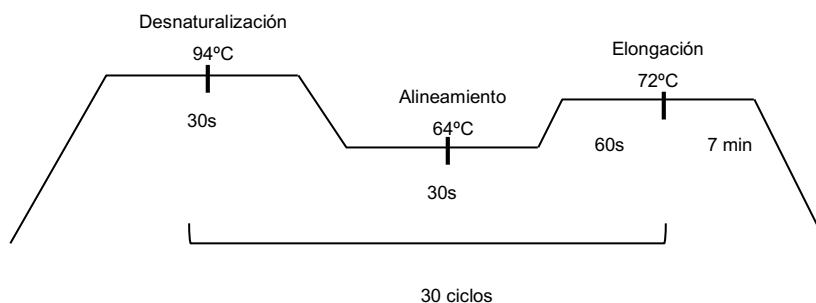


Figura 5.2 Condiciones de la RT-PCR para primers E2p. Condiciones de temperatura y ciclos en la RT-PCR establecidas en el termociclador.

5.3 Clonación

5.3.1 Clonación en vector pET100/D-TOPO

Para inducir la expresión de la proteína recombinante en un sistema procarionte se utilizó el vector pET100/D-TOPO³: un plásmido derivado del pBR322, de 5764 pares de bases (pb), linealizado, de clonación direccional, con extremos romos. Contiene el promotor T7/lac, topoisomerasa I activada, gen de resistencia a ampicilina, así como una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal.

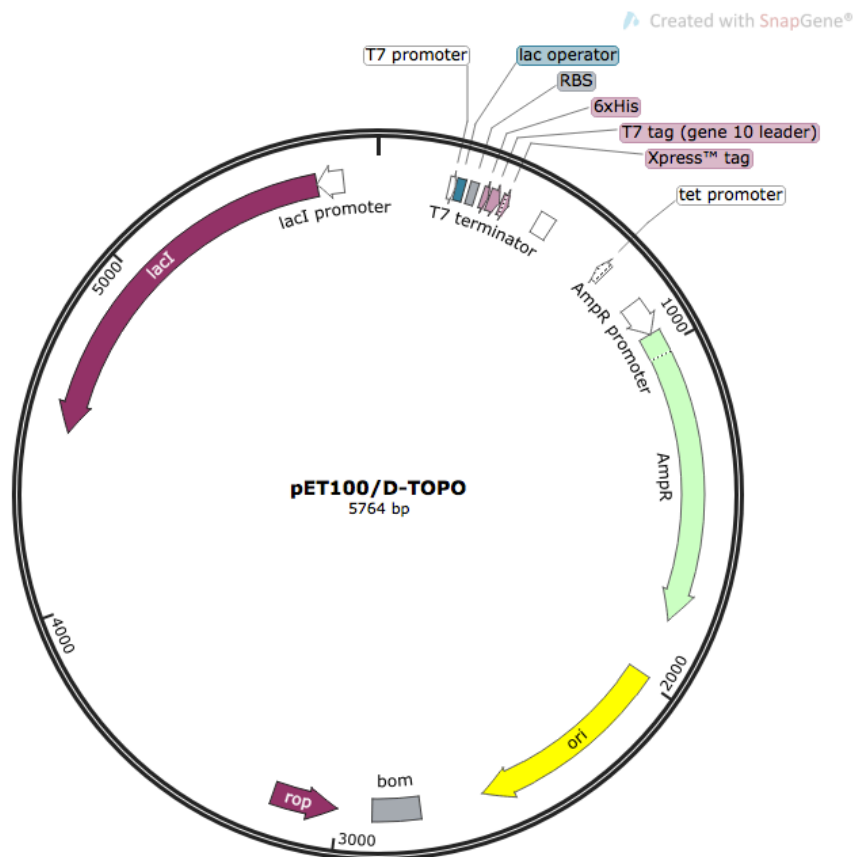


Figura 5.3 Mapa del vector pET100/D-TOPO. Diagrama que representa las principales características del vector de clonación.

La clonación del producto de PCR en el vector se llevó a cabo utilizando una proporción 5:1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, generando el plásmido denominado pET-E2.

³ Invitrogen, Carlsbad, CA

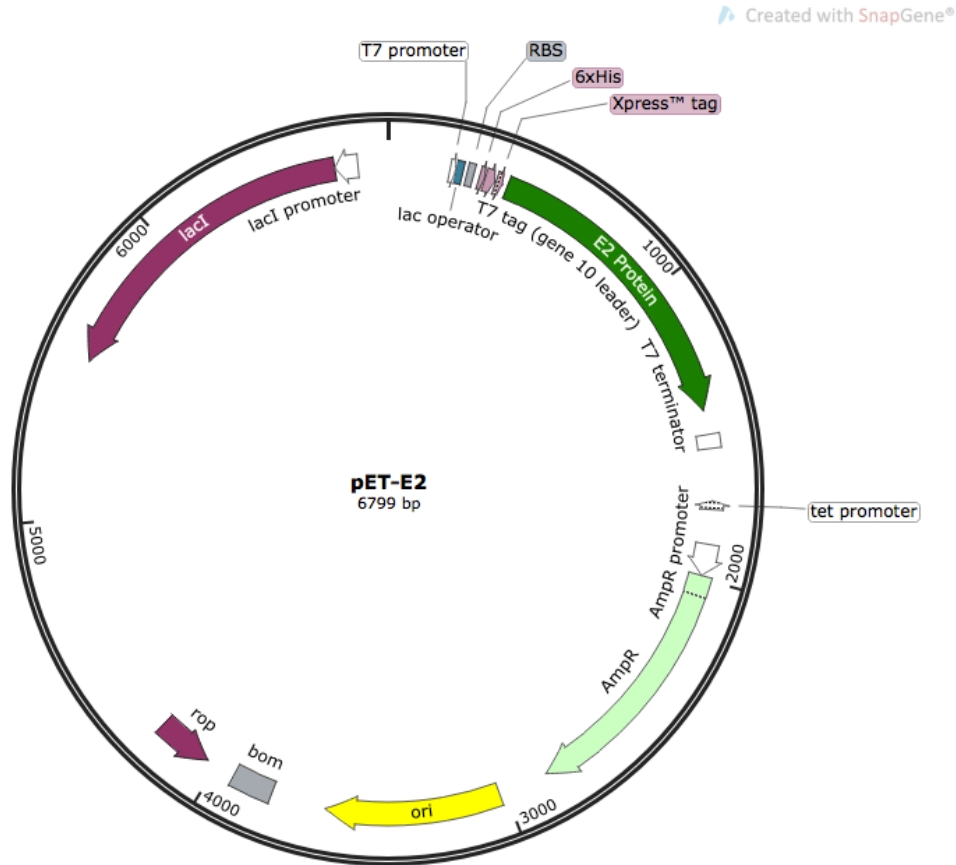


Figura 5.4 Mapa del vector pET-E2. Diagrama que representa las principales características del vector pET-E2.

La reacción de clonación se dejó en incubación por 30 minutos a temperatura ambiente y se conservó a 4°C hasta su uso. Posteriormente el pET-E2 fue transformado en células competentes One Shot® TOP10 de *E. Coli*, las cuales se incubaron en agitación a 200 rpm por una hora para después sembrarlas en agar Luria Bertani (LB) con ampicilina e incubarlas por 16h a 37°C. A partir del cultivo bacteriano se seleccionaron 5 colonias para verificar que el inserto se haya clonado en el vector mediante ensayos de PCR de colonia; dichos productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed®.

5.3.2 Clonación en vector pSecTag2/Hygro A

Se utilizó el vector pSecTag2/Hygro A^{®4} para la expresión de la proteína recombinante en células eucariontes. Este plásmido tiene 5745 pb que contienen el promotor viral CMV, la secuencia de la cadena Ig kappa de ratón, la secuencia codificante del epítopo *c-myc* y 6 histidinas en tándem en el extremo C-terminal; así como los genes de resistencia a ampicilina y a higromicina B.

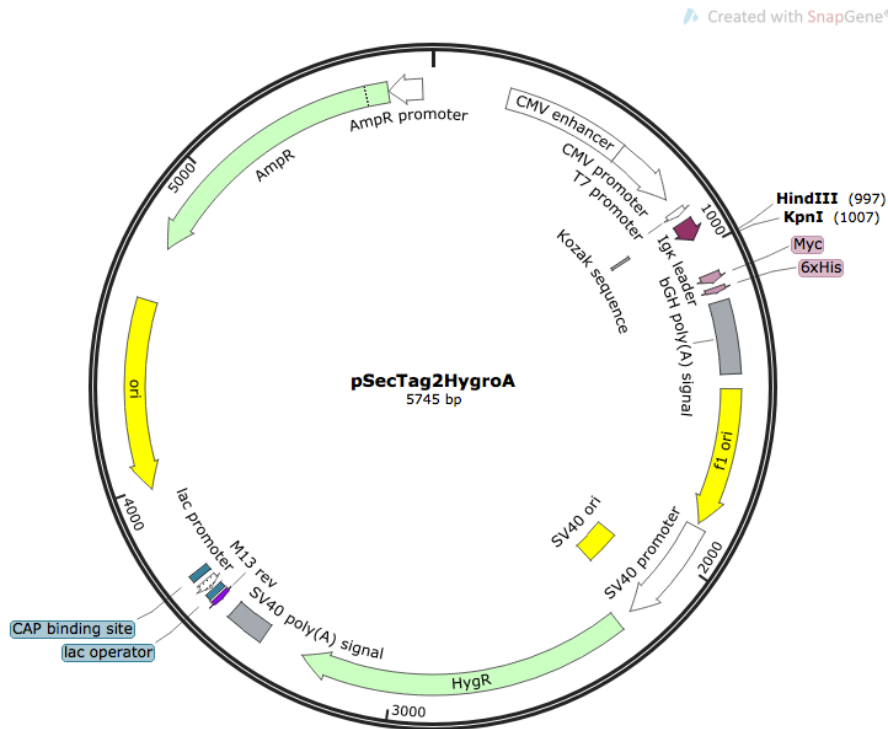


Figura 5.5 Mapa del vector pSecTag2/Hygro A. Diagrama que representa las principales características del vector de clonación.

Para llevar a cabo la clonación del inserto en el plásmido se realizó el siguiente protocolo:

Producto de PCR

- El producto de PCR se sometió a una reacción de digestión con las enzimas *HindIII* y *XhoI* y se purificó el producto digerido mediante el uso del kit MSB Spin PCRAPACE^{®5} para eliminar el exceso de sales.

⁴ Invitrogen, Carlsbad, CA

⁵ stratec molecular

- Se realizó la cuantificación del producto de PCR para utilizar una proporción 5:1 para la reacción de clonación.

Plásmido pSecTag2/Hygro A

- El plásmido comercial se transformó en *E. coli* DH5 α y se purificó mediante el método de lisis alcalina utilizando el kit *GeneJet Plasmid Miniprep* siguiendo recomendaciones del fabricante y las modificaciones reportadas por Peifer *et al* (2016).
- Una vez purificado el plásmido, se digirió utilizando las enzimas *Hind*III y *Xho*I, mismas que fueron inactivadas a 80°C por 20 min.
- Adicionalmente, se sometió el plásmido a un tratamiento de desfosforilación utilizando 1U de CIP.
- Finalmente la reacción se purificó utilizando el kit *GeneJet Gel Extraction*, siguiendo las indicaciones del fabricante y se cuantificó por medio de espectrofotometría⁶.

Una vez purificados el producto de PCR y el vector se realizó la reacción de ligazón utilizando una proporción 5:1 y ligasa T4, generando el plásmido pSecTagE2.

⁶ Nanodrop Spectrophotometer ND1000

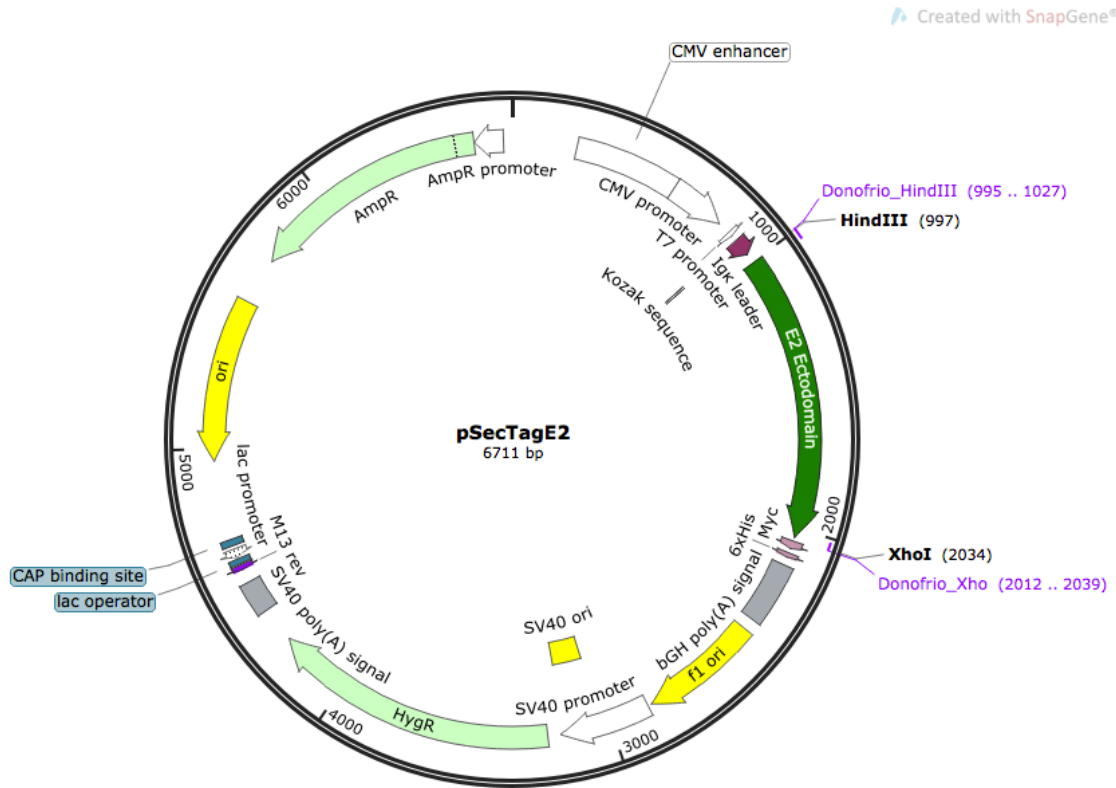


Figura 5.6 Mapa del vector pSecTagE2. Diagrama que representa las principales características del vector pSecTagE2.

Posteriormente, el plásmido denominado pSecTagE2 se transformó en *E. coli* JM101 electrocompetentes para su mantenimiento, posterior extracción y purificación. Una vez transformadas, las bacterias se sembraron en agar LB con carbenicilina y se incubaron a 37°C por 16h. De las colonias crecientes se seleccionaron 5 para llevar a cabo PCR de colonia; dichos productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed®.

5.4 Secuenciación de plásmidos pET-E2 y pSecTagE2

Para ambas construcciones, se realizó extracción de plásmido a las clonas positivas por PCR, utilizando el kit *GeneJet Plasmid Miniprep* siguiendo recomendaciones del fabricante. Para verificar que el inserto estuviera en fase, los plásmidos purificados pET-E2 y pSecTagE2, se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt-UNAM) en donde fueron secuenciados utilizando el secuenciador automatizado ABI Prism 3500xl Genetic

Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Forest City, CA) utilizando los iniciadores para T7.

5.5 Extracción y purificación de plásmidos

Una vez que se corroboró que los plásmidos pET-E2 y pSecTagE2 contenían el inserto de interés en fase, la extracción y purificación del ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina, utilizando el kit *GeneJet Plasmid Miniprep* y *QIAprep Spin Miniprep* siguiendo las indicaciones del fabricante con las modificaciones reportadas por Pronobis *et al* (2016). Ambos plásmidos se cuantificaron por medio de espectrofotometría para realizar la transformación y la transfección respectivamente.

5.6 Inducción de la proteína recombinante E2

Después de verificar que el inserto estaba en fase, se transformó el plásmido pET-E2 en *E. Coli* cepa BL21 (DE3), utilizando el mismo protocolo que se utilizó para la cepa One Shot® TOP10. Se incubaron las células BL21 (DE3) en agitación a 200 rpm a 37°C. Posteriormente, se cultivaron en agar LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron 16h a 37°C. Después de dicha incubación, se seleccionaron 5 colonias y nuevamente se corroboró la presencia del inserto por medio de PCR de colonia. De las colonias positivas se eligió una y se cultivó en medio líquido LB con ampicilina (100 µg/ml). Una vez que el crecimiento del cultivo obtuvo una absorbancia de 0.6 con una longitud de onda de OD₆₀₀, se agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma St. Louis MO, USA) a una concentración de 0.5 mM, para inducir la expresión de la proteína recombinante. Finalmente, la pastilla celular se colectó por centrifugación y junto con el sobrenadante se mantuvo a -20°C, para ser analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% e inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) utilizando anticuerpos anti-HisG®.

5.6.1 Western Blot

Posterior a la separación de proteínas en gel SDS-PAGE al 12%, se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa a 130 mA constante por 1h. Se utilizó marcador de peso molecular preteñido PageRuler™ Fermentas (10-180 kDa).

Brevemente, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0.1% en agitación durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se incubó utilizando anticuerpos anti-HisG[®] (1:4000) por una hora a temperatura ambiente. Una vez concluida la incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.1% de 15 min. Se realizaron geles y Bestern blots de cada una de las condiciones para la inducción de la proteína, así como de los pasos para la purificación.

El revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando el producto *Western Lightning[®] ECL* (Perkin-Elmer) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se utilizó el sustrato luminol y el *enhancer* en una proporción 1:1, se homogenizó y se colocó sobre la membrana. Se establecieron los parámetros para obtener una mejor señal de detección de la proteína al evaluar diferentes tiempos de exposición con un máximo de 12 min utilizando el escáner C-DiGit[®] (LI-COR).

5.6.2 Purificación de la proteína recombinante de bacteria

El pellet celular proveniente de un cultivo bacteriano de 10mL se resuspendió en 3 mL buffer de lisis frío adicionado con 1mg de lisozima. Posteriormente se sonicaron a 6 pulsos por 30s por periodos de descanso de 30s y con una amplitud de 40%; el procedimiento se llevó a cabo en hielo para evitar la desnaturalización de la proteína. Posteriormente se centrifugó el cultivo sonicado a 9000 rpm por 45 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 8mL de buffer de lisis para purificar la proteína por medio de cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La purificación de la proteína se comprobó verificando su presencia en geles de SDS-PAGE al 12% e inmuno-electrotransferencia (*Western blot*) utilizando el anticuerpo anti-His[®].

5.7 Transfección del plásmido pSecTagE2

Una vez obtenida la secuencia y después de verificar que el inserto estuviera en fase, se realizó la transfección del plásmido pSecTagE2 en células HEK293T (*human embryonic kidney cells*). La transfección se llevó a cabo en monoestratos con una confluencia del 80% en placas de 24 pozos, utilizando 1µg de lipofectamina 3000[®] y 1µg

de pSecTagE2 por pozo. Después de una incubación a 37°C con 5% de CO₂ por 48h, se evaluó el sobrenadante para verificar la síntesis de la proteína E2 recombinante cuando el monoestrato de cada pozo alcanzó un 80% de confluencia.

Posterior a confirmar la expresión de la proteína recombinante se procedió al pase de las células transfectadas a cajas de cultivo celular de 100 cm². Lo anterior, para evaluar su crecimiento y propagación utilizando medio selectivo (DMEM + 200ug de higromicina) e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. De manera subsecuente, la formación de colonias celulares, permitió su evaluación de manera individual en una placa de 6 pozos por medio de western blot.

Al confirmar la expresión de la proteína recombinante en el sobrenadante de las colonias celulares, estas se propagaron en botellas de cultivo celular de 125cm² utilizando medio selectivo, para la obtención de proteína recombinante requerida.

5.7.1 Western blot

Se recuperaron sobrenadantes de la placa de células HEK293T para realizar la detección de la proteína en geles de SDS-PAGE al 12% e inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) utilizando anticuerpos anti-His[®] y anti-*myc*[®] y anti-BVDV[®]. Los geles de SDS-PAGE, western blots y el revelado de los mismos se llevó de la misma forma que se mencionan en la sección 5.6.1.

5.7.2 Purificación de proteína recombinante de células eucariontes

Una vez que se confirmó la colonia que sintetizaba la proteína recombinante, el sobrenadante fue utilizado para llevar a cabo la purificación por medio de cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, la purificación de la proteína se comprobó verificando su presencia en geles de SDS-PAGE al 12%. Finalmente, la proteína recombinante se mezcló con el adyuvante Montanide (ISA 61 VG, Seppic[®]) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.7.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la proteína recombinante sintetizada tanto en sistema procarionte como en células eucariontes se realizó por el método de Bradford. Brevemente, se realizaron diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) para obtener una curva de referencia y posteriormente realizar la cuantificación de la proteína recombinante de cada sistema de expresión. Se utilizó una placa de 96 pozos para realizar la cuantificación, se agregaron 20µl de cada muestra+180µl del reactivo de Bradford 1x por pozo; se incubó 5 min en oscuridad a temperatura ambiente y se realizó la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda 595 nm.

5.8 Ensayo de inmunización

5.8.1 Ratones Balb/c

Por cada grupo se utilizaron 8 ratones hembras SPF de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad para realizar los ensayos de inmunización y desafío. Cada grupo experimental estuvo constituido por 6 ratones inoculados y 2 ratones centinela a excepción del grupo 9, el cual estuvo constituido por 3 ratones. Los animales fueron adquiridos en la Unidad de Bioterio del IBt-UNAM, los cuales se mantuvieron en la unidad de desafío microbiológico (UNIDESMIC, ubicada en la FMVZ-UNAM) bajo las siguientes condiciones:

- Charolas estériles independientes para manejo de animales de experimentación
- Cuarto limpio (352,000 partículas /m³ no mayores a 0.5 µm como máxima concentración)
- Humedad relativa de 40%-70%
- Ventilación de más de 15 recambios de aire por hora
- Control de fotoperiodo (ciclos 12:12 h)
- Control de Intensidad lumínica (300- 1350 lúmenes)
- Control de Temperatura (18-26 °C)
- Cuarto limpio con diseño tipo *In Side* permite mantener el nivel de ruido no mayor a los 85 db

- Revisión diaria de animales de experimentación

La dieta consistió en alimento peletizado estéril (*Laboratory Rodent Diet 5001*) y agua proporcionada *ad libitum*.

Grupos experimentales:

- Grupo 1: ratones inoculados con 50 µg de proteína recombinante E2 sintetizada en células eucariontes (E2e) sin adyuvante
- Grupo 2: ratones inoculados con 50 µg de proteína recombinante E2 sintetizada en células eucariontes (E2e) con ISA 61 VG
- Grupo 3: ratones inoculados con 50 µg de proteína recombinante E2 sintetizada en bacteria (E2p) sin adyuvante
- Grupo 4: ratones inoculados con 50 µg de proteína recombinante E2 sintetizada en bacteria (E2p) con poliacrilamida
- Grupo 5: ratones inoculados con vacuna comercial contra el VDVB
- Grupo 6: ratones inoculados con la cepa de referencia NADL
- Grupo 7: ratones inóculados con solución salina fisiológica (SSF) con ISA 61 VG
- Grupo 8: ratones inóculados con SSF con poliacrilamida
- Grupo 9: ratones inoculados con SSF

La identificación de cada animal y el grupo al que pertenecen se muestran en el Anexo 1. El manejo de animales, revisión, cambio de cama y alimento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en gabinete de bioseguridad nivel 2.

5.8.2 Protocolo de inmunización y desafío

Los grupos de ratones BALB/c se inmunizaron por vía intraperitoneal (IP) administrando 3 dosis del inóculo correspondiente a cada grupo (Fig. 5.7)

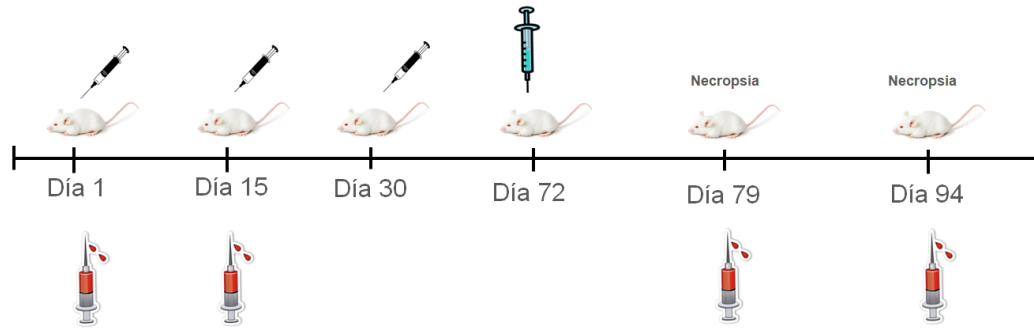





Figura 5.7 Esquematización del protocolo de inmunización y desafío. En donde  representa los días en los que se realizaron las inmunizaciones,  los días en donde se hizo toma muestras de sangre y  el día del desafío.

Previo a la primera y segunda inoculación se realizó punción del seno retro-orbital (Fig. 5.8) para la toma de muestra sanguínea utilizando capilares de vidrio estériles sin anticoagulante. Adicionalmente antes de cada necropsia se obtuvo muestra de sangre total por vía intracardiaca. Las muestras de sangre se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min a 4°C; posteriormente se recuperó el suero de cada muestra y se conservó a -20°C hasta su uso.

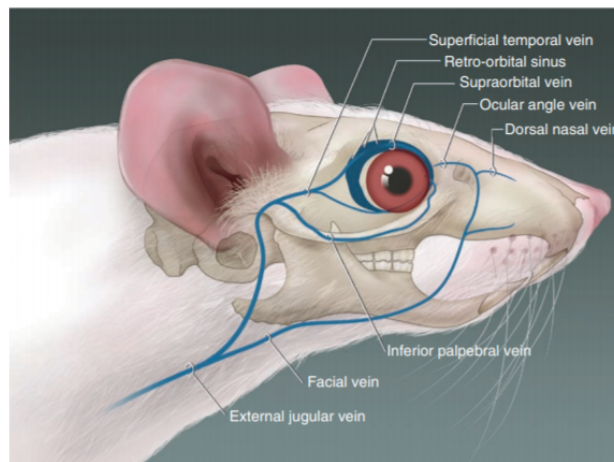


Figura 5.8 Ilustración del seno retro-orbital (Yardeni *et al.*, 2011).

Posteriormente, los ratones fueron desafiados 6 semanas después de la tercera inmunización, con una cepa homóloga virulenta del VDVB utilizando una dosis de

$1 \times 10^{6.2}$ DICCC50/ml la cual se administró vía orogástrica (OG) con el uso de una cánula esofágica calibre 18 x 1.5" (Cadence Science, Inc.). (Fig 5.8)

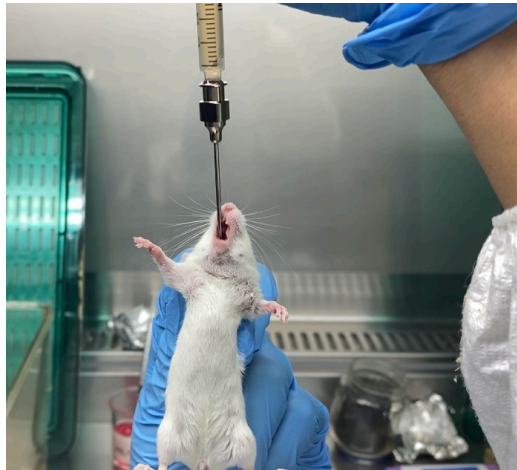


Figura 5.9. Inoculación vía orogástrica de cepa de desafío.

Una vez realizado el desafío y hasta la necropsia se llevó a cabo la revisión diaria del comportamiento y presentación de signos clínicos; se realizó toma de temperatura corporal (diario) y peso (cada tercer día). Se realizó la necropsia a la mitad de los ratones por grupo (inmunizados y un centinela) al día 7 post desafío, y al día 21 post desafío a los animales restantes.



Figura 5.10. Obtención de temperatura corporal y peso

5.8.3 Titulación de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB

Para realizar la prueba de neutralización viral (NV) se utilizó la línea celular MDBK y las muestras de suero de los ratones inmunizados. Debido a la cantidad de muestra de suero obtenida de cada individuo, se realizaron *pools* de sueros de animales con las mismas características; es decir, se evaluaron los sueros de animales centinelas y animales vacunados y desafiados de cada grupo por separado.

Los sueros se inactivaron en baño María a 56°C durante 1h. Se realizaron diluciones dobles seriadas de cada uno de los sueros utilizando como diluyente DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium*); los sueros se diluyeron desde 1:4 hasta 1:32768 en placas de 96 pozos; realizando 3 repeticiones por muestra, para lo cual se utilizaron 3 pozos por cada *pool* de suero (Fila A, columnas 1-3), y sus respectivas diluciones (Fila A-H). Posteriormente, se adicionó la cepa del VDVB inoculada en el desafío utilizando una MOI de 0.5. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por una hora. Una vez transcurrido este tiempo se adicionaron 20,000 células MDBK en suspensión en 100 µl de DMEM, por pozo. Finalmente, las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 4 días para realizar la lectura final. Los títulos de neutralización viral se expresaron como el recíproco de la diluación más alta que neutralizó la infectividad vital.

Para determinar el título de anticuerpos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Log}_2(\text{end-point dilution}) = \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i} \right)$$

x_0 = log₂ de la dilución más baja en donde todos los pozos son positivos

d = log₂ de la dilución

n_i : número de repeticiones (3)

r_i : número de pozos positivos

5.8.4 Determinación de eficiencia protectora en ratones inmunizados

Se realizó la necropsia de la mitad de los ratones de cada grupo a los 7 y 21 días post-desafío. La técnica de necropsia se llevó a cabo de acuerdo con la descrita por Parkinson *et al* (2011) en donde los ratones de cada grupo experimental se sacrificaron con CO₂ para obtener muestras de encéfalo, pulmón, estómago, hígado, bazo, intestino delgado y riñón. La mitad de la muestra de cada órgano se mantuvo a -70°C hasta su

uso para la detección del genoma del VDVB por RT-PCR; la otra mitad de la muestra se fijó en solución amortiguada de formol al 10% para estudios de histopatología e inmunohistoquímica.

5.8.4.1 Extracción de ARN y RT-PCR a partir de órganos

Se realizó la extracción de ARN total a partir de encéfalo, pulmón, estómago, hígado, bazo, intestino y riñón de cada animal utilizando 0.5 cm³ aproximadamente de cada órgano. Tanto la extracción de ARN como la RT-PCR se realizaron bajo condiciones de esterilidad. Cada órgano una vez descongelado se maceró y se recuperó en tubos de microcentrifuga estériles y se adicionó 1mL de Trizol® Reagent, se homogeneizó por 10 s y se incubó a 4°C por 10 min; posteriormente, se adicionaron 200 µl de cloroformo se homogeneizó por 10 s, se incubó a 4°C por 10 min y se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min. El sobrenadante se recuperó en tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 mL y se adicionó 600 µl de isopropanol; se incubó por 1h a -20°C y se centrifugó a 14 000 rpm por 20 min a 4°C. Finalmente, el pellet de ARN se lavó con 1 mL de etanol al 70% con agua DEPC, se retiró el excedente de etanol y se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min para resuspenderse en 40 µl de agua libre de nucleasas. Las muestras se conservaron a -70°C hasta su uso.

Para realizar la RT-PCR se utilizaron los de iniciadores y condiciones de amplificación reportados por Mahony et al., (2005), los cuales se enlistan en el cuadro 5.5 y Figura 5.11 respectivamente.

Iniciador	Sentido	Secuencia	Tamaño del producto	Autor
5UTR/START	<i>Forward</i>	CTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTA	292 pb	Mahony <i>et al.</i> , (2005)
	<i>Reverse</i>	CAACTCCATGTGCCATGTACAGCA		

Cuadro 5.5 Iniciadores utilizados para amplificar un fragmento de la región 5'UTR del VDVB.

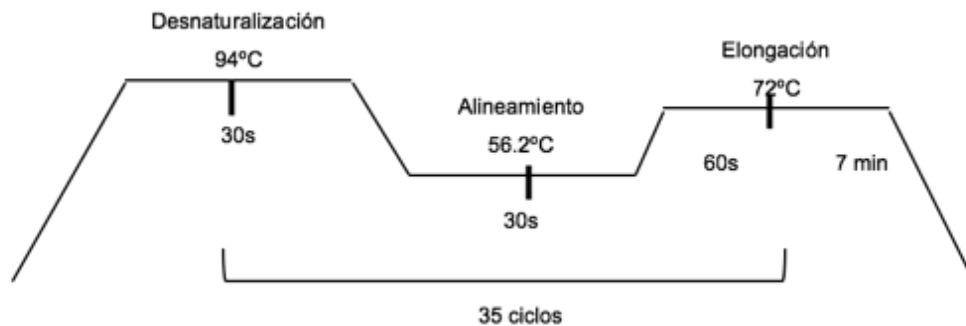


Figura 5.11 Condiciones de la RT-PCR para iniciadores 5UTR/START. Condiciones de temperatura y ciclos en la RT-PCR establecidas en el termociclador.

5.8.4.1.1 Análisis jerárquico de conglomerados

El análisis jerárquico de conglomerados de dos vías (TWHCA, por sus siglas en inglés), es un método estadístico que clasifica los objetos en grupos o *clusters* de acuerdo a las similitudes entre ellos (Mooi y Sarsted, 2011). En éste análisis se consideraron los resultados obtenidos de la RT-PCR a partir de cada uno de los órganos de los animales inmunizados de cada grupo experimental en una matriz de dos dimensiones (N x M), en donde N representa el número de los grupos experimentales y M los resultados de la RT-PCR en cada órgano. Los animales centinelas fueron excluidos de éste análisis.

El objetivo del análisis de conglomerados es descubrir un sistema de organización de observaciones en donde los miembros del grupo comparten propiedades específicas en común (Yim y Ack Baraly, 2015). Como resultado, la inferencia se representa con un dendograma utilizando un mapa de calor para demostrar los valores con diferente correlación para cada grupo experimental. El análisis estadístico mencionado se realizó utilizando la paquetería de JMP Versión 11.

5.8.4.2 Histopatología

Para determinar la capacidad protectora de las proteínas recombinantes utilizadas en este estudio se evaluó la presencia de lesiones y alteraciones microscópicas, en los tejidos previamente mencionados, asociadas a la infección por el VDVB utilizando la técnica descrita por Heffes y Mullick (1995).

Para lo anterior, los tejidos fijados por 48 h en formol se incluyeron en casetes de plástico depositándose en un histoquinete convencional (Leica) para su procesamiento automatizado. Los tejidos incluidos se deshidrataron en serie ascendente de etanoles, 80, 95 y 100%, alcohol absoluto-xileno relación 1:1 y después se depositaron en dos cambios de xilol y uno en parafina. Posteriormente, los tejidos se retiraron del casete para incluirlos en el fondo de un molde metálico y se embebieron en parafina líquida dejándose solidificar a temperatura ambiente por 15 min y después en refrigeración a 4°C por 30 min. Una vez solidificada la parafina se realizaron cortes de 4 µm de grosor utilizando un micrótomo estándar (Leica). Los cortes se extendieron en baño María de flotación y se recuperaron montándose en portaobjetos convencionales y se incubaron a 100°C por 10 min para quitar exceso de parafina.

Finalmente, los cortes se tiñeron con hematoxilina & eosina (H&E) para su revisión por microscopía óptica convencional. El nivel de severidad de las lesiones se clasificaron de la siguiente manera: incipiente (-/+), leve (+), leve/moderado (+/++), moderado (++) , moderado/severo (++/+++) y severo (+++); así mismo se agregó la siguiente escala de colores para facilitar la visualización de los resultados:

Incipiente	Leve	Leve/moderado	Moderado	Moderado/Severo	Severo
-/+	+	+/++	++	++/+++	+++

5.8.4.3 Inmnohistoquímica

Para la identificación específica del VDVB en las muestras de órganos mencionados, se utilizó la prueba de inmnohistoquímica (IHQ) con el método de detección complejo avidina-biotina peroxidasa (Invitrogen). Como controles positivos se utilizaron los cortes de tejidos obtenidos de animales inoculados con el VDVB cepa NADL, en las cuales se había identificado previamente el VDVB por RT-PCR punto final. Como controles negativos se utilizaron los mismos cortes de tejido sustituyendo el anticuerpo primario por PBS-Tween 20.

Para la IHQ se llevó a cabo el mismo procesamiento de las muestras de órganos que para la tinción de H&E, los cortes se montaron en laminillas electrocargadas y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Los cortes se desparafinaron con calor (56°C) y dos lavados de xilol por 8 min. Los residuos de xilol se eliminaron con alcohol absoluto y se rehidrataron con serie descendente de etanoles (96, 80, 70%) y agua destilada; se bloqueó la peroxidasa, biotina y avidina endógenas con peróxido de hidrógeno al 30%-metanol absoluto y biotina-avidina con soluciones comerciales respectivamente (*life-technologies*) en cámara húmeda a 37°C. Posteriormente, se bloquearon los sitios de adherencia inespecífica para anticuerpos con solución bloqueadora (Biocare medical). Se realizó la incubación con anticuerpo primario anti-VDVB (VRMD 3.12F1) y secundario biotinilado (Invitrogen); finalmente, se adicionó el conjugado enzimático estraptavidina-peroxidasa (Invitrogen), y tanto la incubación de anticuerpos, así como la peroxidasa se incubaron en cámara húmeda a 37°C. Para determinar la presencia de antígeno viral en los tejidos, a cada corte se agregó solución comercial de revelado compuesta por cromógeno (diaminobencidina betazoide (DAB)) y solución amortiguadora de la reacción (Biocare Medical). Después de agregar la solución reveladora se observó la reacción del color por microscopía óptica (40s aproximadamente) y, hasta visualizar el cambio de color se detuvo la reacción con agua destilada. Los cortes se contrastaron con hematoxilina de Meyer y se lavaron con agua destilada, para aclarar el tono de la hematoxilina se utilizó alcohol ácido y carbonato de litio por 1 min. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente colocar resina y cubreobjetos. Estas fueron revisadas por microscopía óptica convencional en donde el nivel de inmunopositividad se determinó con base en la intensidad del inmunomarcaje de la siguiente manera: incipiente (-/+), leve (+), moderado (++) , moderado/severo (++)/+++ y severo (+++); así mismo se agregó la siguiente escala de colores para facilitar la visualización de los resultados:

Incipiente	Leve	Moderado	Moderado/Severo	Severo
-/+	+	++	++/+++	+++

5.8.4.3.1 Análisis estadístico

La prueba *t-student* ($P < 0.05$) se utilizó para evaluar el nivel de anticuerpos neutralizantes inducidos como respuesta a la inmunización en cada grupo experimental. Lo anterior, se realizó utilizando la paquetería de Graph Pad Prism versión 6.0 (Graph Pad Prism, Software Inc. La Jolla CA).

Así mismo, con base en la IHQ, a los niveles de inmunopositividad se les asignó un valor numérico (puntaje), con base en la cantidad de cruces asignadas en cada tejido. Los datos obtenidos se compararon entre grupos utilizando análisis de varianza ANOVA de una vía y HSD de Tukey. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando la paquetería de JMP versión 11; las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en donde $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$.

6. Resultados

6.1 Amplificación de fragmento del gen E2

Se realizó la amplificación del ectodominio de la proteína E2 del VDVb, a partir de la cepa de referencia NADL utilizando los dos juegos de iniciadores denominados E2p y E2e (Fig.6.1).

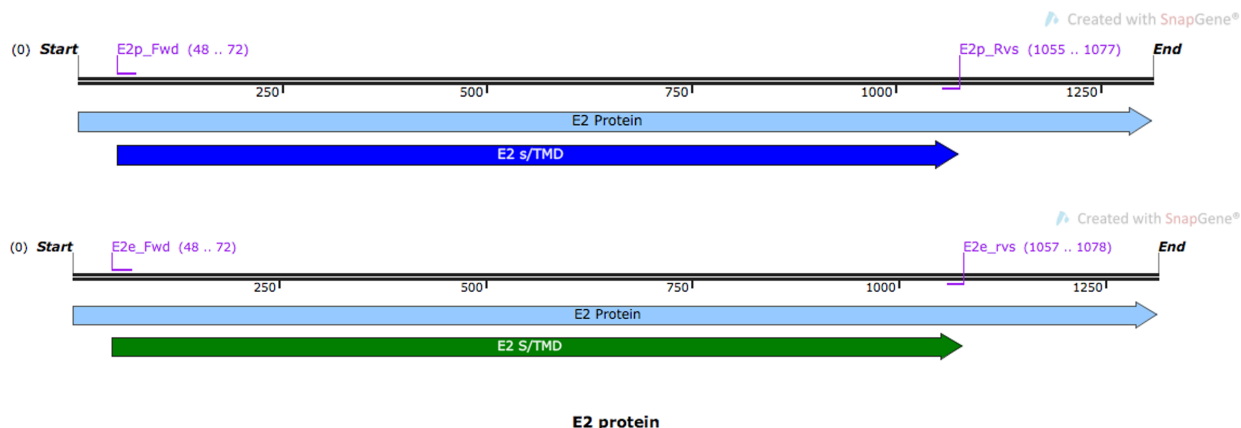


Figura 6.1. Esquema del gen de la glicoproteína E2 del BVDV. En la imagen se muestra en azul claro el tamaño completo del gen que codifica para la glicoproteína E2 del VDVb. Las flechas en color azul rey y verde corresponden a la región que amplifican los juegos de iniciadores E2p y E2e, respectivamente.

Como resultado se obtuvieron dos productos de PCR de 1030 pb y 1031 pb respectivamente (Fig 6.2). Lo anterior, con el objetivo que los productos amplificados incluyan secuencias específicas para su clonación en los vectores comerciales pET100/D-TOPO y pSecTag/HygroA, como se menciona en el apartado 5.5.2 del presente trabajo. En la figura 6.1 y 6.2 se muestran los productos de PCR con el tamaño esperado utilizando los primers E2p y E2e, de 1030 y 1031 pares de bases (pb), respectivamente.

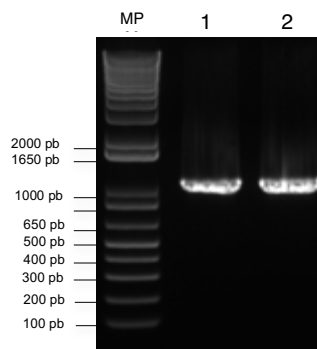


Figura 6.2 Productos de la RT-PCR utilizando los iniciadores E2p y E2e. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con GelRed®. Carril 1: MPM 1 Kb Plus Ladder, carril 2: Amplificación del ectodominio E2 utilizando iniciadores E2p, carril 3: Amplificación del ectodominio E2 utilizando iniciadores E2e.

De manera subsecuente, para inducir la expresión de la proteína recombinante en un sistema procarionte, el producto de PCR amplificado con los iniciadores E2p se clonó en el vector pET100/D-TOPO generando el plásmido denominado pET-E2. Así mismo, para la expresión de la proteína recombinante en células eucariontes el el producto de PCR amplificado con los iniciadores E2e se clonó en el vector pSecTag/HygroA generando el plásmido pSecTagE2 (Fig 5.4 y 5.6, respectivamente).

6.2 Secuenciación de los plásmidos pET-E2 y pSecTagE2

Se realizó la secuenciación de los plásmidos pET-E2 y pSecTagE2 utilizando el iniciador de T7 para verificar que el inserto estuviera en fase; es decir, comprobar que el inserto haya sido clonado en dirección correcta y en posición adecuada de lectura para su posterior expresión. Las secuencias obtenidas de los plásmidos pET-E2 y pSecTagE2 se analizaron con el software SnapGene® (Fig. 6.3 y 6.4 respectivamente); asimismo cada una de las secuencias fue analizada con la herramienta BLAST para determinar identidad genética.

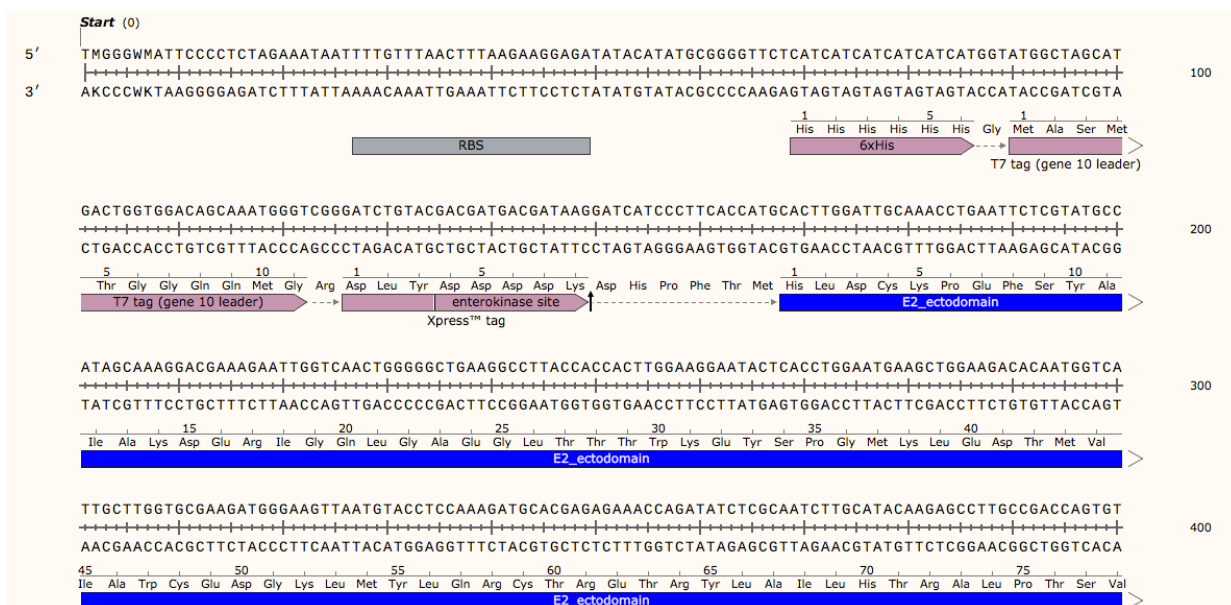


Figura 6.3 Análisis de secuencia del plásmido pET-E2. Análisis de la secuencia obtenida del plásmido para confirmar que el inserto esta en fase.

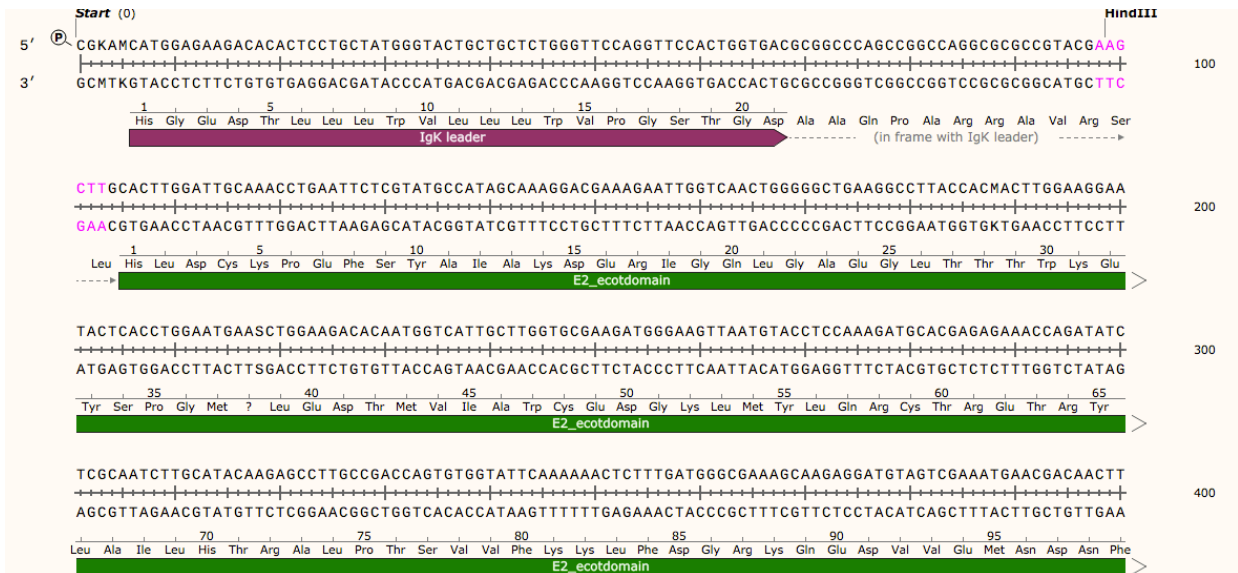


Figura 6.4 Análisis de secuencia del plásmido pSecTagE2. Análisis de la secuencia obtenida del plásmido para confirmar que el inserto estuviera en fase.

El análisis de las secuencias mostró que ambas construcciones estaban en fase; esto es que la inserción del fragmento genético que codifica para el ectodominio de la glicoproteína E2 en cada uno de los vectores, se realizó manteniendo el ORF. Una vez corroborada la orientación de los insertos, se llevó a cabo la inducción y la transfección de los plásmidos pET-E2 y pSecTagE2, respectivamente.

6.3 Inducción de la proteína recombinante

6.3.1 Análisis de proteínas

Se realizó la inducción de la proteína recombinante en *E. Coli* cepa BL21 (DE3) utilizando IPTG e incubando el cultivo a 27°C y 37°C con agitación de 200 rpm y se tomó una muestra de cada cultivo cada 2 horas para determinar temperatura y tiempo óptimo para la inducción. Cada muestra se centrifugó y tanto el sobrenadante como el pellet fueron analizados en geles de SDS-PAGE al 12%, los cuales se muestran en las figuras 6.5 y 6.6. En ambas figuras se observa una banda de mayor intensidad de tinción con un tamaño aproximado de 43.3 kDa, la cual corresponde a la proteína de interés inducida, misma que se corrobora con ensayos de *Western blot*. Las condiciones bajo las cuales se observa una mejor inducción de la proteína fueron: incubación a 37°C por 6 h con agitación de 200 rpm.

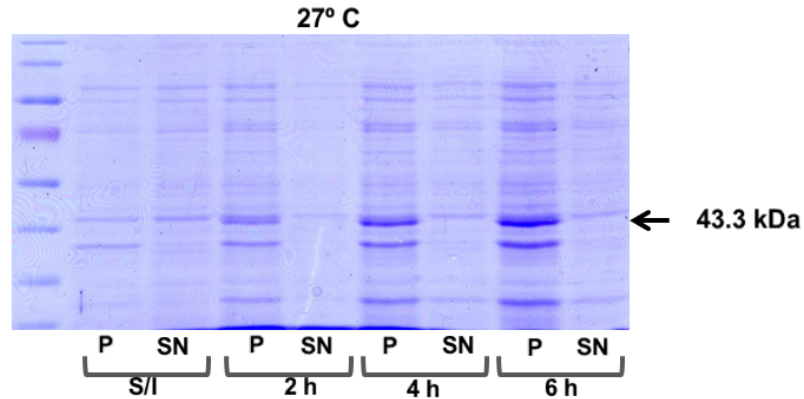


Figura 6.5. Inducción de proteína recombinante a 27°C. Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomasie. Carril 1: MPM, carril 2: pellet de cultivo sin inducir, carril 3: sobrenadante de cultivo sin inducir, carril 4: pellet cultivo 2h, carril 5: sobrenadante cultivo 2h, carril 6: pellet cultivo 4h, carril 7: sobrenadante cultivo 4h, carril 8: pellet cultivo 6h, carril 9: sobrenadante cultivo 6h. S/I: sin inducir, P: pellet, SN: sobrenadante.

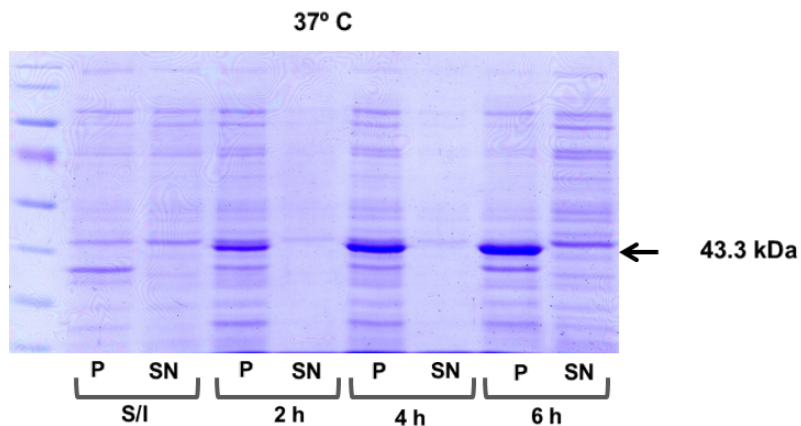


Figura 6.6. Inducción de proteína recombinante a 37°C. Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomasie. Carril 1: MPM, carril 2: pellet de cultivo sin inducir, carril 3: sobrenadante de cultivo sin inducir, carril 4: pellet cultivo 2h, carril 5: sobrenadante cultivo 2h, carril 6: pellet cultivo 4h, carril 7: sobrenadante cultivo 4h, carril 8: pellet cultivo 6h, carril 9: sobrenadante cultivo 6h. S/I: sin inducir, P: pellet, SN: sobrenadante.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la inducción de la proteína recombinante, el cultivo bacteriano inducido se sonicó para liberar las proteínas sintetizadas. Después de centrifugar las bacterias lisadas por sonicación, se analizó el sobrenadante y el pellet obtenido en un gel de SDS-PAGE al 12%; en donde se visualizó la proteína recombinante en el pellet, y no en sobrenadante demostrando así que la proteína recombinante es insoluble(Figura 6.7).

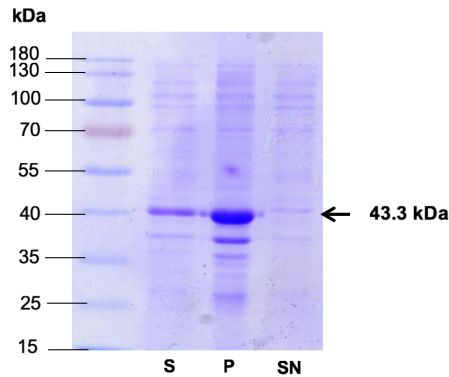


Figura 6.7. Determinación de la insolubilidad de proteína recombinante. Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomasie. Carril 1: MPM, carril 2: cultivo sonificado, carril 3: pellet de cultivo sonificado, carril 4: sobrenadante de cultivo sonificado. S: cultivo sonificado, P: pellet, SN: sobrenadante.

6.3.2 Western blot de proteína recombinante

Para confirmar que la banda que se observó en los geles de SDS-PAGE correspondía a la proteína E2 recombinante, se realizó la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa para detectar dicha proteína mediante el uso del anticuerpo monoclonal Anti-HisG, dirigido contra la etiqueta de polihistidinas localizada en el extremo N-terminal de la proteína. Se evaluaron diversas concentraciones del anticuerpo, siendo la dilución 1:4000 la ideal para la inmunodetección de la proteína. La proteína se evidencia por la presencia de una banda que corresponde al peso estimado de 43.3 kDa (Figura 6.8).

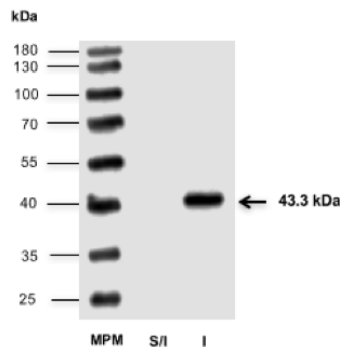


Figura 6.8. Western blot de proteína E2 recombinante. Inmunodetección de proteína E2 recombinante. Carril 1: MPM, carril 2: cultivo de *E. coli* cepa BL21 (DE3) sin inducir, carril 3: cultivo de *E. coli* cepa BL21 (DE3) inducido con 0.5mM de IPTG. La flecha indica el peso molecular de la proteína recombinante. S/I: sin inducir, I: inducido.

6.3.3 Purificación de proteína recombinante

Una vez detectada la proteína por medio de western blot, se llevó a cabo su purificación por medio de cromatografía de afinidad a níquel. Este método de separación se basa en la unión específica entre la etiqueta de histidinas, incluida en la construcción del vector comercial, con iones metálicos como el Ni^{2+} inmovilizados en la matriz de cromatografía de afinidad. En la figura 6.9 se muestran los pasos del protocolo de purificación.

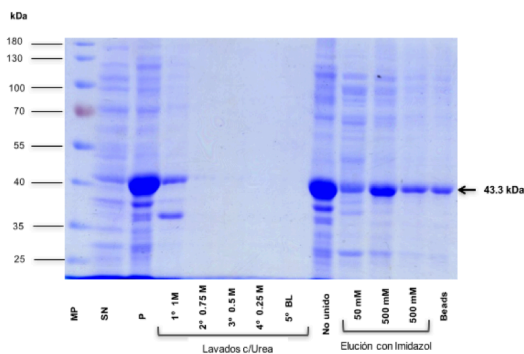


Figura 6.9. Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomassie. Carril 1: MPM, carril 2: sobrenadante de cultivo sonificado, carril 3: pellet de cultivo sonificado, carril 4-8: lavados con urea, carril 9: no unido a perlas, carril 10-12: elución, carril 13: perlas Ni-NTA sonificado. SN: sobrenadante P: pellet, BL: buffer de lisis.

6.4 Transfección del plásmido pSecTagE2

6.4.1 Western blot de proteína recombinante

Inicialmente, la transfección del plásmido pSecTagE2 de en células HEK293T se realizó en placas de 24 pozos con 80% de confluencia, las cuales se incubaron por 48 h. Una vez transcurrido este tiempo, se evaluó la presencia de la proteína recombinante en las células transfectadas y su sobrenadante por medio de Western blot. En la figura 6.10 se muestran los western blots en donde se analizaron células HEK293T sin transfectar y su sobrenadante en los carriles 2 y 3, mientras que en los carriles 3 y 4 de cada ensayo se muestra el análisis de células HEK293T transfectadas y su sobrenadante utilizando los anticuerpos anti-His[®] y anti-myc[®] y anti-BVDV[®] (Fig. 6.10 A-C, respectivamente)

Adicionalmente, en este análisis se incluyeron controles positivos de detección de etiquetas del vector; en donde la proteína BirA se utilizó como control positivo para la detección del epítipo myc (Fig. 6.10 A), mientras que la proteína

Subolesin se utilizó como control positivo de detección de la etiqueta 6x-His (Fig. 6.10 B).

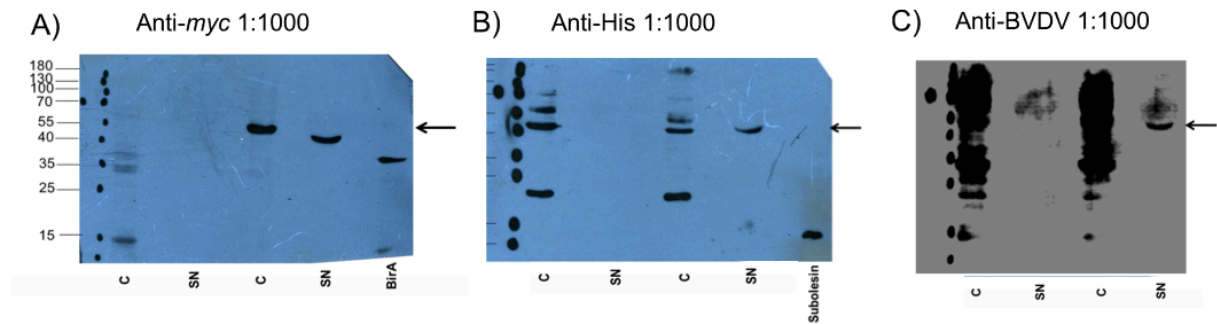


Figura 6.10. *Western blots* de proteína recombinante. A) *Western blot* con anti-myc; Carril 1: MPM, carril 2: células sin transfectar, carril 3: sobrenadante de células sin transfectar, carril 4: células transfectadas, carril 5: proteína control BirA. B) *Western blot* con anti-His; Carril 1: MPM, carril 2: células sin transfectar, carril 3: sobrenadante de células sin transfectar, carril 4: células transfectadas, carril 5: proteína control (Subolesin). C) *Western blot* con anti-BVDV; Carril 1: MPM, carril 2: células sin transfectar, carril 3: sobrenadante de células sin transfectar, carril 4: células transfectadas. (C: células SN:sobrenadante).

Una vez que se comprobó la expresión de la proteína E2, se realizó el pase de células del pozo transfectado a una caja de cultivo celular de 100 cm² para evaluar su crecimiento utilizando medio selectivo (DMEM + 200ug de higromicina) incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Como control se utilizaron células HEK293T sin transfectar, las cuales fueron incubadas bajo las mismas condiciones. Posteriormente, en células transfectadas se observó la formación de colonias celulares separadas en la caja de cultivo celular (Fig. 6.11). De estas, se eligieron 6 colonias celulares y se transfirieron a una placa de 6 pozos para evaluar la expresión de la proteína recombinante por colonia. Esta placa se incubó hasta obtener una confluencia del 80% y se evaluó el sobrenadante de cada pozo para detectar la presencia de la proteína recombinante por *Western blot* utilizando los anticuerpos antes mencionados (Fig. 6.12).

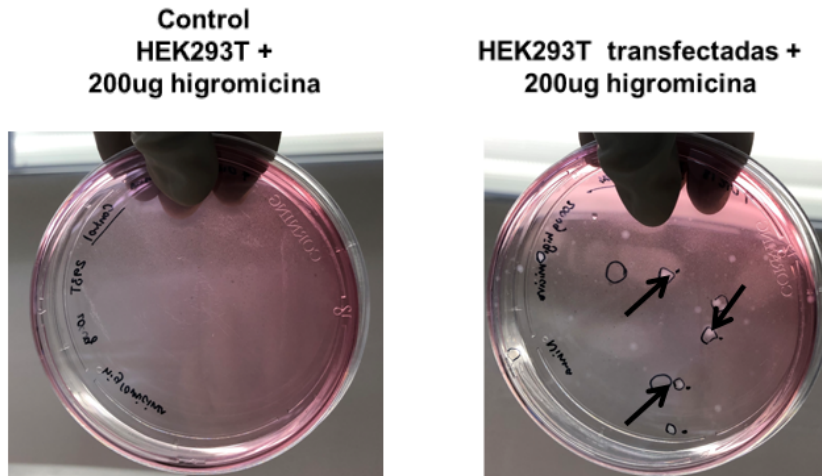


Figura 6.11. Formación de colonias celulares de HEK293T. Crecimiento de células HEK293T transfectadas con el plásmido pSecTagE2 suplementadas con medio de selección (DMEM+200µg de higromicina).

Esta placa se incubó hasta obtener una confluencia del 80% y se evaluó el sobrenadante de los 6 pozos para detectar la presencia de la proteína recombinante por *Western blot* utilizando los anticuerpos antes mencionados. Se detectó la presencia de la proteína recombinante en las colonias 3 y 4, siendo el sobrenadante de la colonia celular 4 en la que se detectó mayor proporción de proteína (Fig. 6.12). Por lo tanto, la colonia 4 fue utilizada para su propagación en botellas de cultivo celular de 125 cm² y posterior obtención de proteína recombinante requerida para el presente estudio.

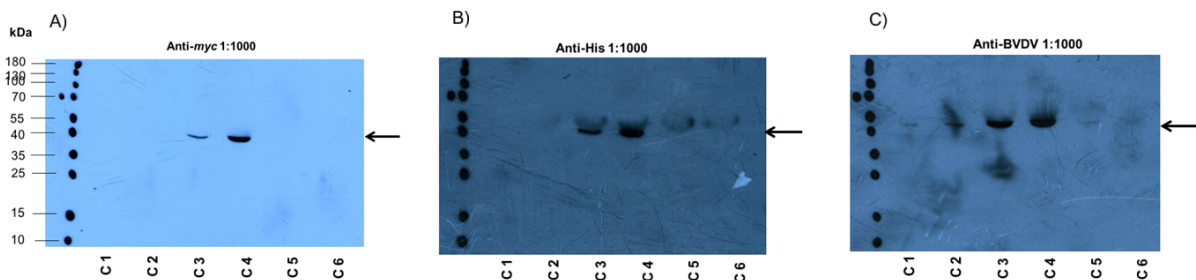


Figura 6.12. *Western blots* de proteína recombinante. A) *Western blot* con anti-myc; Carril 1: MPM, carril 2: Colonia 1, carril 3: Colonia 2, carril 4: Colonia 3, carril 5: Colonia 4, carril 6: Colonia 5, carril 7: Colonia 6. B) *Western blot* con anti-His; Carril 1: MPM, carril 2: Colonia 1, carril 3: Colonia 2, carril 4: Colonia 3, carril 5: Colonia 4, carril 6: Colonia 5, carril 7: Colonia 6. C) *Western blot* con anti-BVDV Carril 1: MPM, carril 2: Colonia 1, carril 3: Colonia 2, carril 4: Colonia 3, carril 5: Colonia 4, carril 6: Colonia 5, carril 7: Colonia 6. C: Colonia.

6.4.2 Purificación de proteína recombinante

La purificación de la proteína se llevó a cabo por medio de cromatografía de afinidad a níquel. La fracción eluida fue analizada en geles de SDS-PAGE al 12% para visualizar la pureza de la proteína recombinante. En la figura 6.13 se muestra la elución por cada 5 ml de sobrenadante de cultivo celular, así como el *Western blot* utilizando anticuerpos anti-His[®]. Finalmente, se realizó la formulación del inmunógeno a una concentración de la proteína recombinante purificada de 100 µg/ml y se mezcló con el adyuvante Montanide (ISA 61 VG, Seppic[®]) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

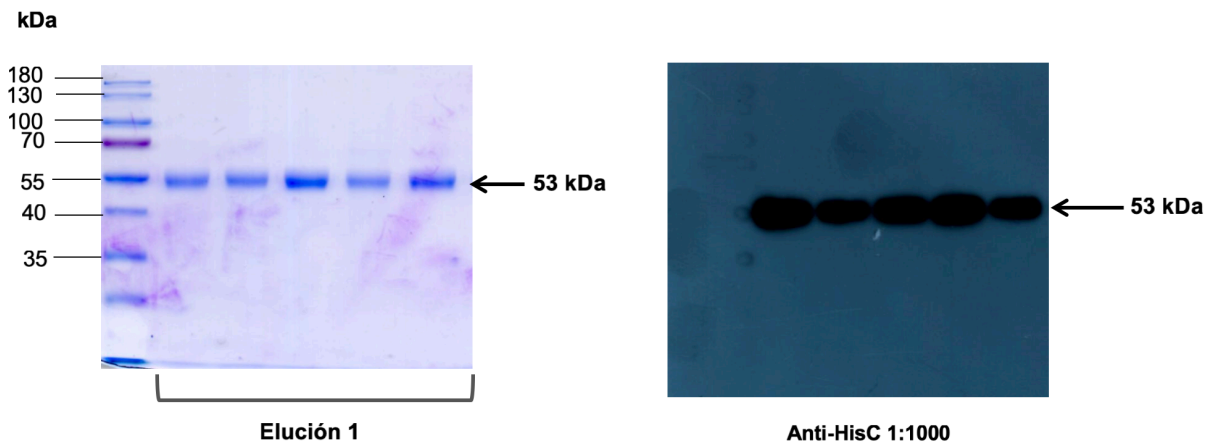


Figura 6.13. Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomassie y *Western blot*. Carril 1: MPM, carril 2-4: Elución 1 a partir de 5ml de sobrenadante de cultivo celular. La flecha indica la detección de la proteína recombinante en el peso esperado.

6.5 Signos clínicos en animales de experimentación

Con la finalidad de determinar el efecto de la inoculación de la cepa del VDVB en los animales de experimentación se realizó la revisión diaria de la condición física y de salud de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales.

Los animales que fueron sometidos al desafío con la cepa del VDVB se mantuvieron en buena una condición física y no presentaron signos clínicos a lo largo de la fase experimental, manteniendo una temperatura promedio de 36.5°, temperatura

corporal normal en esta especie (Fig. 6.14). Posterior al desafío, no se detectó fiebre en ningún día (superior a 38°C).

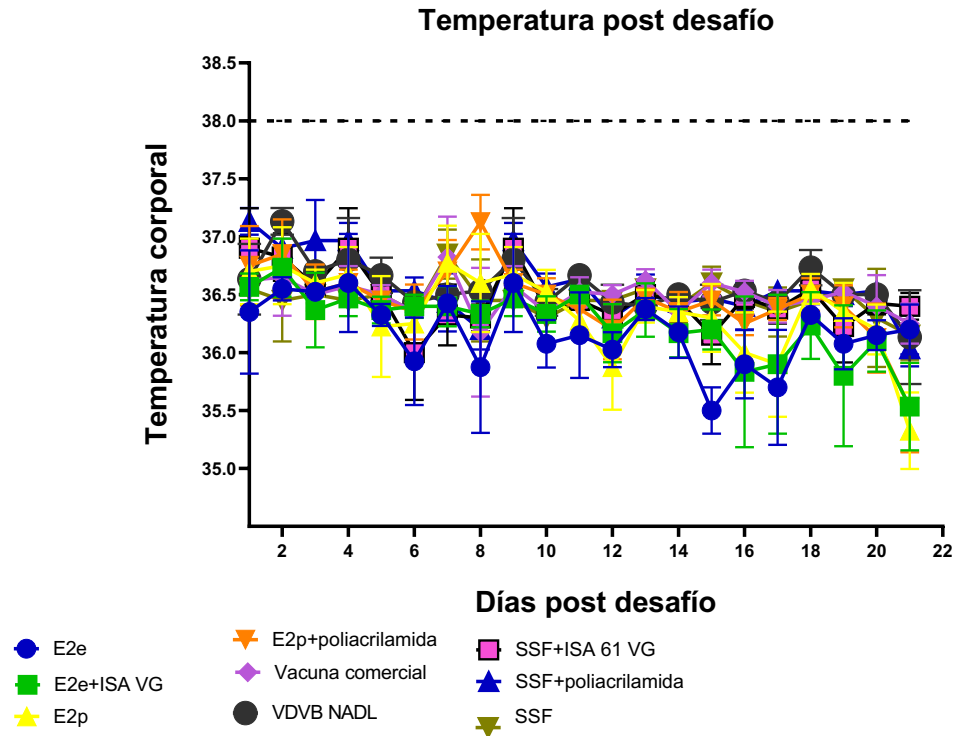


Figura 6.14 Temperatura corporal post desafío. En la gráfica se representan los valores de la temperatura corporal diaria de los animales durante 21 días posterior al desafío, por grupo. La línea punteada indica el valor a partir del cual la temperatura se considera como fiebre.

Así mismo, no hubo disminución del peso de los animales sometidos al proceso de experimentación (Fig. 6.15). No hubo cambios en su comportamiento o estado de ánimo. Adicionalmente, durante la necropsia no se encontraron lesiones compatibles con la infección por el VDVb en bovinos.

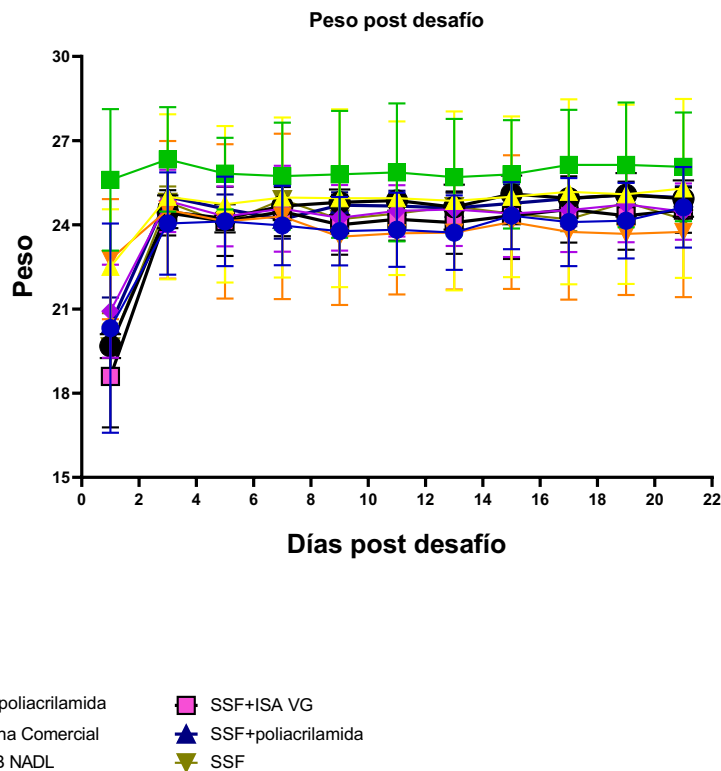


Figura 6.15. Peso corporal de los ratones post desafío. En la gráfica se representan los valores del peso de los animales durante 21 días posterior al desafío, por grupo.

6.6 Titulación de anticuerpos neutralizantes y análisis estadístico

El objetivo de realizar la NV a partir de las muestras de sueros fue detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra la cepa de desafío VDVB tipo 1a, en muestras de sueros de los animales pertenecientes a los grupos experimentales. La neutralización viral fue detectada por la inhibición de la infectividad viral, evidenciada por la ausencia de efecto citopático (vacuolización y muerte celular).

Se realizaron 3 tomas de muestra de suero: día 1, antes de la primera inmunización; día 15, antes de la segunda inmunización; y día 79 y 94 antes de la primera y segunda necropsia, respectivamente. Se generaron *pools* de sueros de animales centinela y por separado los de animales inmunizados de cada grupo experimental.

Se determinó que los ratones centinelas del grupo 1, 2, 3 y 4 así como los ratones centinelas e inmunizados de los grupos 6, 7 y 8, y el grupo 9 no desarrollaron

respuesta humoral detectable, ya que la presencia de anticuerpos neutralizantes no pudo ser evidenciada en la prueba (Figura 16.6 y Cuadro 6.1).

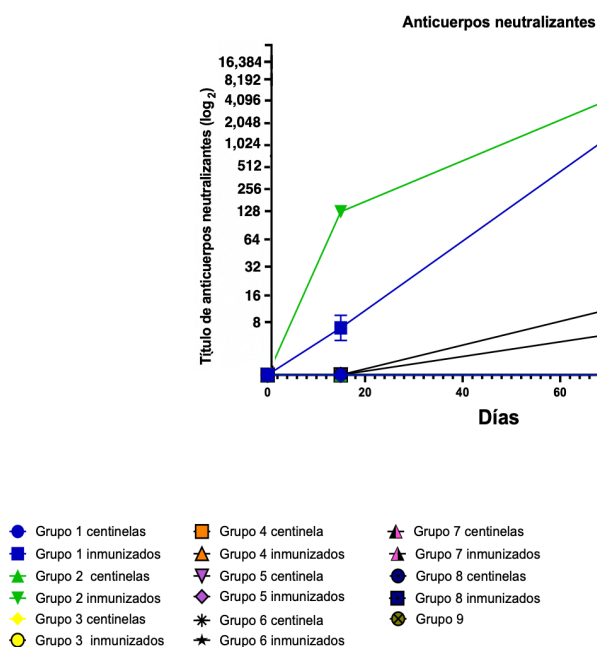


Figura 6.16. Título de anticuerpos neutralizantes. En la gráfica se muestra el título de anticuerpos neutralizantes en animales centinela e inmunizados por grupo.

Por el contrario, en el caso de los ratones inmunizados pertenecientes a los grupos 1, 2, 3 y 4 que corresponden a los grupos en donde se utilizaron las proteínas recombinantes como inmunógenos: E2e, E2e+ISA 61 VG, E2p, E2p+poliacrilamida respectivamente, se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes en diferentes niveles, los cuales se muestran en la figura 6.17 y en el Cuadro 6.1.

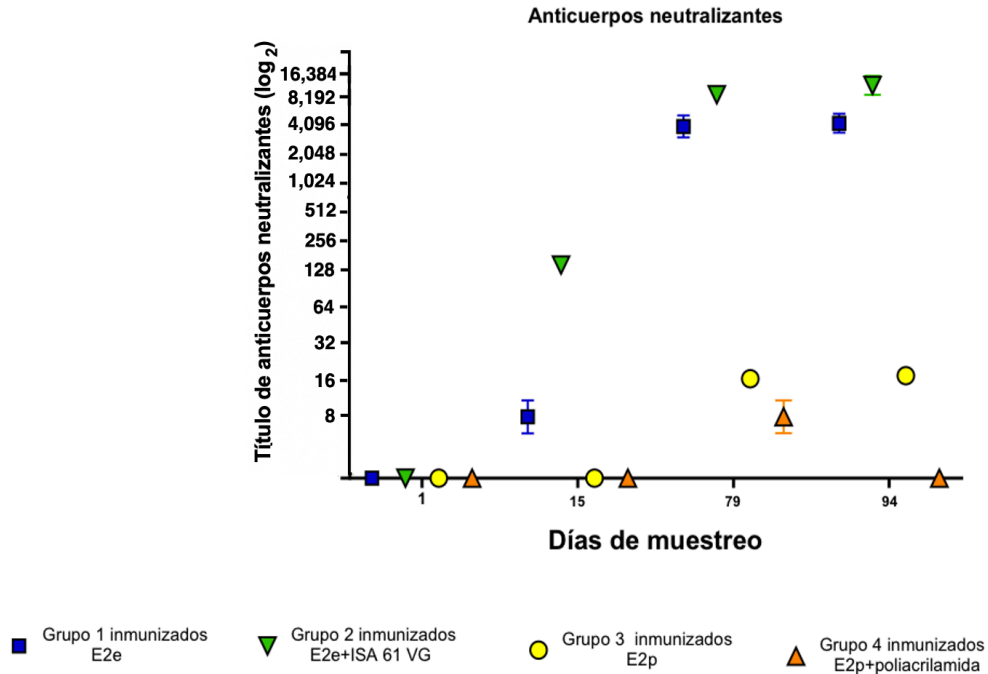


Figura 6.17. Título de anticuerpos neutralizantes grupos 1, 2, 3 y 4. En la gráfica se muestra el título de anticuerpos neutralizantes en animales inmunizados pertenecientes a los grupos 1-4, considerando las 4 tomas de muestra a los días 1,15, 79 y 94.

Utilizando la prueba estadística *t-student* ($P < 0.05$) se observaron diferencias significativas entre los animales de los grupos 1, 2, 3 y 4 inmunizados con las proteínas recombinantes antes mencionadas (Cuadro 6.1).

Grupos experimentales	Días	<i>P value</i>			
		Grupo 1 E2e	Grupo 2 E2e +ISA 61 VG	Grupo 3 E2p	Grupo 4 E2p +poliacrilamida
Grupo 1 E2e	1		No	No	No
	15		0.000091	0.002978	0.002978
	79		0.00749	0.000002	0.000014
	94		0.007981	0.000002	<0.000001
Grupo 2 E2e+ISA 61 VG	1			No	No
	15			<0.000001	<0.000001
	79			<0.000001	<0.000001
	94			<0.000001	<0.000001
Grupo 3 E2p	1				No
	15				No
	79				0.015997
	94				0.000005
Grupo 4 E2p+poliacrilamida	1				
	15				
	79				
	94				

Cuadro. 6.1. Niveles de significancia estadística. Se muestra el nivel de significancia estadística al comparar los títulos de anticuerpos de cada grupo.

La actividad por anticuerpos neutralizantes fue detectada desde los 15 días después de la vacunación en los animales inmunizados pertenecientes a los grupos 1 y 2. La inmunización con E2e+ISA 61VG (grupo 2) indujo los títulos de neutralización viral (VNT) más altos contra la cepa de desafío, los cuales fueron calculados desde 1:128, 15 días después de la primera aplicación; para el día 79 y 94 alcanzaron un VNT de 1:8192 a 1:16384 respectivamente. En comparación con el grupo 1, en donde en animales vacunados con la proteína recombinante E2e sin adyuvante se detectó un VNT de 1:4 a 1:8 después de la primera inmunización; sin embargo, para los días 79 y 94 del ensayo incrementaron significativamente hasta 1:4096.

Por el contrario, los animales inmunizados de los grupos 3 y 4 mostraron actividad neutralizante por anticuerpos hasta los días 79 y 94. El VNT estimado en estos días en los animales del grupo 3, inmunizados con la proteína E2p, fue de 1:8 a 1:16; mientras que para los animales del grupo 4, inmunizados con la proteína E2p+poliacrilamida, se detectaron VNT de 1:4 a 1:8 al día 79 e indetectables para el día 94.

Los resultados obtenidos, evidencian que el nivel de anticuerpos neutralizantes inducidos en los grupos 1 y 2 son significativamente mayores que los generados en los grupos 3 y 4 ($p < 0.05$). En particular, la respuesta obtenida por los animales inmunizados con E2e + ISA 61VG es significativamente mayor en comparación con los demás grupos a partir de los 15 post inoculación ($p < 0.001$) del inmunógeno hasta el término del ensayo (Cuadro 6.1); demostrando que, en dicho grupo los VNT altos se alcanzan desde una etapa temprana, después de la primera inmunización en comparación con los demás grupos. De la misma forma, en el caso del grupo 1 los VNT se ven incrementados después de la primera inmunización; sin embargo, el título alcanzado en este tiempo es significativamente menor que el alcanzado por el grupo 2. Así mismo la respuesta detectada al final del ensayo aumenta considerablemente, pero se mantiene significativamente menor en comparación con el grupo 2. Lo anterior, podría tener un impacto en el desarrollo de lesiones en etapa temprana o tardía causadas por el VDVB de desafío.

En contraste, los resultados obtenidos por los grupos inmunizados con proteínas recombinantes E2 con y sin poliacrilamida, grupos 3 y 4 respectivamente, no demuestran VNT altos. Por el contrario, en ambos grupos los anticuerpos neutralizantes fueron detectados hasta el día 79 del ensayo con VNT significativamente menores que los estimados en los grupos 1 y 2. El comportamiento de la respuesta entre el grupo 3 y 4 no es significativamente diferente desde el inicio hasta el día 79 del ensayo; al día 94, el grupo 4 disminuye por completo el título de anticuerpos, mientras que el grupo 3 mantiene niveles similares al día 74. Los resultados de las neutralizaciones virales se describen por número de muestreo y pool de suero de los animales en el Cuadro 6.2, así como los niveles de significancia estadística en el Cuadro 6.1:

Grupo	Tipo de animal	Título de anticuerpos neutralizantes 4 a 16384			
		Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo	Cuarto muestreo
1	Centinela	0	0	0	0
	Inmunizado	0	4-8	2048-4096	4096
2	Centinela	0	0	0	0
	Inmunizado	0	128	8192	8192-16384
3	Centinela	0	0	0	0
	Inmunizado	0	0	8	8-16
4	Centinela	0	0	0	0
	Inmunizado	0	0	4-8	0
5	Centinela	0	0	0	0
	Inmunizado	0	0	0	0
6	Centinela	0	0	0	0
	Inmunizado	0	0	0	0
7	Centinela	0	0	0	0
	Inmunizado	0	0	0	0
8	Centinela	0	0	0	0
	Inmunizado	0	0	0	0
9	Inmunizado	0	0	0	0

Cuadro 6.2. Resultados de la neutralización viral. Se muestran los resultados de neutralización viral por cada pool de sueros evaluados, así como por grupo experimental.

6.7 RT-PCR a partir de órganos

Los resultados obtenidos de la RT-PCR se muestran resumidos en el siguiente cuadro (Cuadro 6.2). Se muestran los resultados de la RT-PCR obtenidos por órgano en cada individuo; los órganos evaluados fueron: cerebro, pulmón, estómago, hígado, bazo, intestino y riñón. Las identificaciones de los animales centinela se muestran en negritas, en color azul se distinguen los animales a los que se les practicó la necropsia 7 días post desafío y en color blanco aquellos sometidos a necropsia 21 días post desafío. Los resultados positivos a la RT-PCR se resaltan en color verde.

RT-PCR							
Grupo 1	Cerebro	Pulmón	Estómago	Hígado	Bazo	Intestino	Riñón
66	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
5	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
8	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
3	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
6	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)

Grupo 2	Cerebro	Pulmón	Estómago	Hígado	Bazo	Intestino	Riñón
16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
14	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
47	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)

Grupo 3	Cerebro	Pulmón	Estómago	Hígado	Bazo	Intestino	Riñón
23	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
19	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
20	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
21	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
24	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
17	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
18	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
22	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Grupo 4	Cerebro	Pulmón	Estómago	Hígado	Bazo	Intestino	Riñón
32	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
26	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
27	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
29	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
31	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
25	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
28	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
30	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

Grupo 5	Cerebro	Pulmón	Estómago	Hígado	Bazo	Intestino	Riñón
40	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
33	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
35	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)

36	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
39	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
34	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
37	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
38	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

Grupo 6	Cerebro	Pulmón	Estómago	Hígado	Bazo	Intestino	Riñón
48	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
41	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
43	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
46	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
44	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
42	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
45	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

Grupo 7	Cerebro	Pulmón	Estómago	Hígado	Bazo	Intestino	Riñón
56	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
49	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
52	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
54	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
55	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
50	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
51	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)	(+)
53	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

Grupo 8	Cerebro	Pulmón	Estómago	Hígado	Bazo	Intestino	Riñón
63	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

57	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
61	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
64	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
60	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
62	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Grupo 8	Cerebro	Pulmón	Estómago	Hígado	Bazo	Intestino	Riñón
13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
70	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Cuadro 6.3 Resultados RT-PCR a partir de muestras de cerebro, pulmón, estómago, hígado, bazo, intestino y riñón. Para cada grupo experimental, se indica el número de identificación de cada animal. En negritas se resaltan los animales centinela.

6.7.1 Análisis jerárquico de conglomerados

El TWHCA nos permitió evaluar las diferencias en la respuesta al desafío con el VDVB generada en cada grupo experimental al utilizar los diferentes protocolos de inmunización. En la primera dimensión de este el análisis se muestra una clara división en 3 grupos o clusters: el cluster 1 (azul) está representado únicamente por el grupo 2 de animales inmunizados con E2e + ISA 61VG; en el cluster 2 (verde) se incluyen los grupos 3, 5, 6, 7 y 8 que corresponden a los grupos inmunizados con E2p, vacuna comercial, VDVB cepa NADL, SSF + ISA 61VG y SSF + poliacrilamida, respectivamente; en cluster número 3 (rojo) esta formado por los grupos 1 en donde los animales fueron inmunizados con E2e y el grupo 4 en donde a los animales los animales se les inoculó E2p + poliacrilamida.

Los colores en el mapa de calor representan los porcentajes de positividad en la RT-PCR de cada órgano por grupo; el color rojo simboliza mayor porcentaje de positividad en la RT-PCR, mientras que el color verde se refiere a un menor porcentaje de positividad en la prueba.

En el análisis de la segunda dimensión del TWHCA, se distinguen dos clusters basados en la detección del VDVB por RT-PCR en los órganos evaluados. Con base en este análisis, el pulmón, hígado, bazo y cerebro representan los tejidos que nos permiten evaluar mejor las diferencias entre grupos experimentales.

El cluster 1 es representado por el grupo 2 el cual está asociado a resultados negativos en la RT-PCR de los órganos evaluados en la mayoría de los animales. Por lo tanto, se infiere que en los órganos negativos a la RT-PCR no hubo replicación del VDVB o una disminución de esta. Por el contrario, el cluster 2 en donde se encuentran los grupos 3, 5, 6, 7 y 8, está asociado a una mayor proporción de tejidos positivos a VDVB por RT-PCR. Por último, el cluster 3 incluye los grupos 1 y 4, en estos aproximadamente la mitad de los tejidos son clasificados como positivos y la otra mitad como negativos el VDVB.

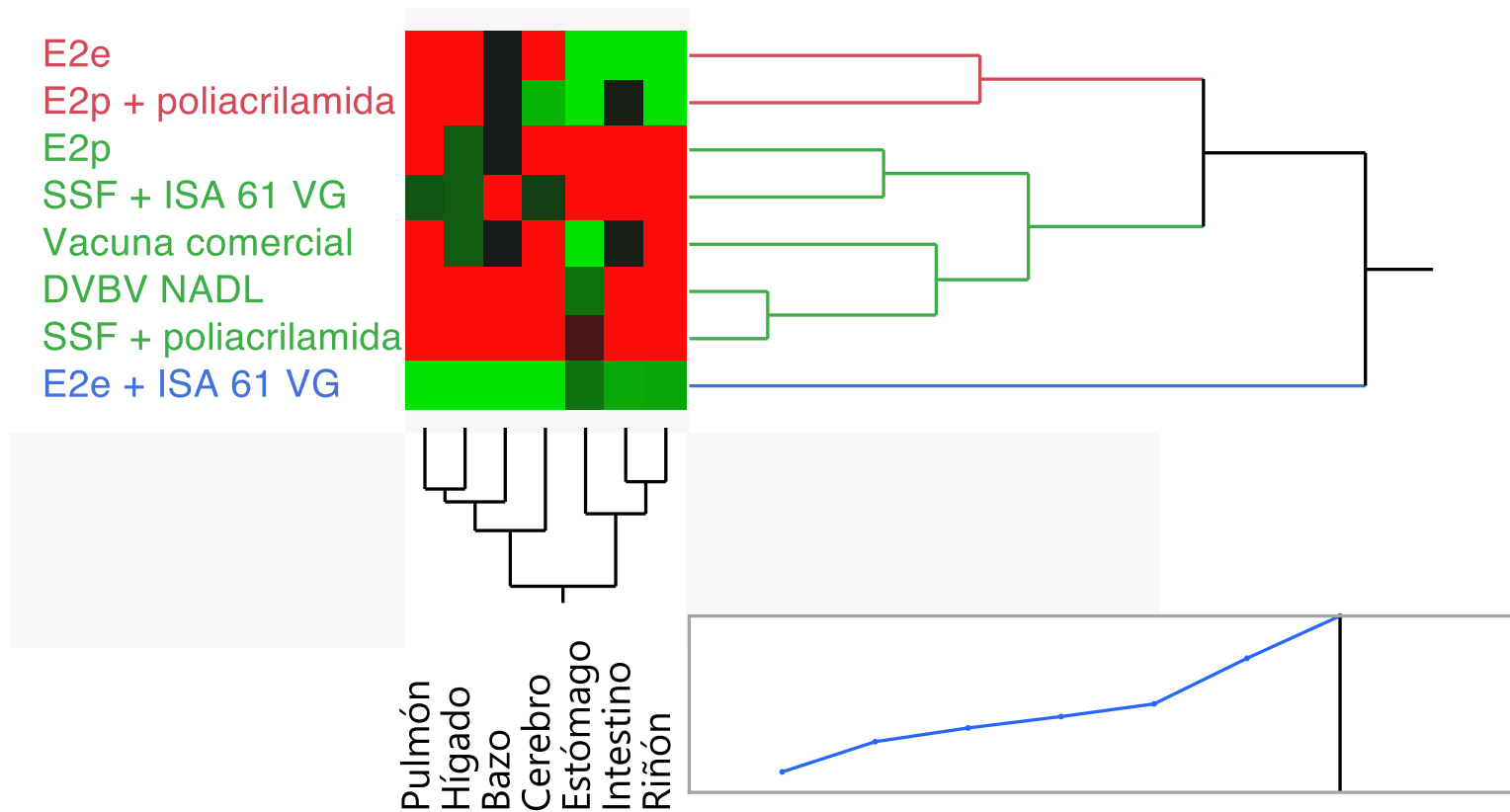


Figura 6.18 Análisis jerárquico de conglomerados. Los animales inmunizados de cada grupo experimental se agruparon en 3 clusters. Los colores en el mapa de calor representan los valores de porcentajes de positividad en la RT-PCR por órgano/grupo; valores altos se representan en color rojo y valores bajos se representan en color verde.

6.8 Histopatología

La evaluación histopatológica se realizó en pulmón, estómago, intestino, hígado, bazo, riñón y cerebro colectados a los 7 y 21 días post desafío. Las laminillas fueron evaluadas para identificar lesiones asociadas a la infección por el VDVB.

En los grupos 6, 7 y 8, utilizados como grupos control de la infección del VDVB cepa NADL en ratones, se observaron lesiones muy bien definidas en las que se incluyen neumonía intersticial, hiperplasia del BALT, despoblación linfóide, necrosis coagulativa multifocal, necrosis tubular aguda, glomerulitis, nefritis, encefalitis, gliosis y necrosis neuronal; con excepción del estómago en donde no hubo alteraciones en ninguno de los grupos.

Se demostró que los animales que conformaron los 9 grupos experimentales presentaron alteraciones en los diversos tejidos con grado y distribución variable. El nivel de severidad de las lesiones se clasificó como incipiente (-/+), leve (+), leve/moderado (+/++), moderado (++) , moderado/severo (++/+++) y severo (+++); así mismo se agregó la siguiente escala de colores para facilitar la visualización de los resultados:

Incipiente	Leve	Leve/moderado	Moderado	Moderado/Severo	Severo
-/+	+	+/++	++	++/+++	+++

De manera particular se describen las alteraciones y grado de severidad de las alteraciones por órgano: en pulmón, se observó congestión y neumonía intersticial de leve a moderada difusa. En algunos individuos se observó hiperplasia de tejido linfóide asociado a bronquios (BALT) leve (Fig. 6.19 A). A nivel de estómago no se detectaron lesiones específicas, únicamente un individuo presentó hiperplasia de tejido linfóide asociado a mucosa (MALT) moderado. En intestino se apreció infiltrado inflamatorio intersticial de leve a severo (Fig. 6.19 B). En hígado se presentó necrosis coagulativa multifocal de leve a moderado/severo, infiltrado inflamatorio intersticial de incipiente a

leve/moderado y congestión (Fig. 6.19 C). En el caso del bazo, se observó congestión y despoblación linfocítica de incipiente a moderado (Fig. 6.19 D). Las lesiones identificadas en riñón fueron necrosis tubular aguda de incipiente a leve, glomerulitis de leve a moderado, nefritis de leve a moderado y congestión (Fig. 6.19 E). Por último, en cerebro se observó encefalitis que varió de incipiente a moderada, necrosis neuronal de leve a moderada en los animales del grupo 6 y leve en los grupos 7 y 8; así mismo, se detectó gliosis en grados de leve a moderado (Fig. 6.19 F).

De forma comparativa, los órganos de los animales vacunados con la proteína E2 emulsionada con el adyuvante ISA VG 61, al igual que los centinelas de este grupo, mostraron una evidente disminución de las lesiones mencionadas a los 7 y 21 días post desafío en comparación con los demás grupos inmunizados ya sea con la proteína E2e sin adyuvante, E2p o la vacuna comercial. Adicionalmente, fue el único grupo en donde los animales inmunizados no presentaron despoblación linfocítica en bazo, ni lesiones a nivel renal; solo un ratón, sometido a necropsia a los 21 días post desafío presentó lesiones leves en pulmón, hígado y cerebro, mientras que los animales restantes no presentaron éstas alteraciones en dichos órganos. Asimismo, los animales identificados con el número 9, 10 y 14 mostraron lesiones clasificadas desde de incipientes a nulas en todos los tejidos; esto concuerda con los resultados obtenidos en la RT-PCR de los ratones 9 y 10. Por otro lado, en los animales inmunizados del grupo 1 (E2e) no se encontró lesión a nivel neurológico, un evento que no se observó en ninguno de los grupos experimentales sometidos a inmunización.

Además, los grupos 3 y 4 inmunizados con la proteína E2p y E2p+poliacrilamida respectivamente, mostraron lesiones en todos los órganos evaluados, con excepción del riñón; en donde a los 7 días post desafío no se observaron alteraciones patológicas en ambos grupos. Asimismo, 21 días post desafío en el grupo 3 los animales no tuvieron cambios patológicos en cerebro detectables. Los animales centinelas de ambos grupos mostraron lesiones similares a las ocasionadas en los animales inmunizados de los grupos mencionados.

De manera general, los grupos 3, 4 y 5 mostraron un incremento en la severidad de las alteraciones en tejidos, comparables con los ocasionados en los grupos testigo positivos, en comparación con los hallazgos microscópicos detectados en el grupo 2.

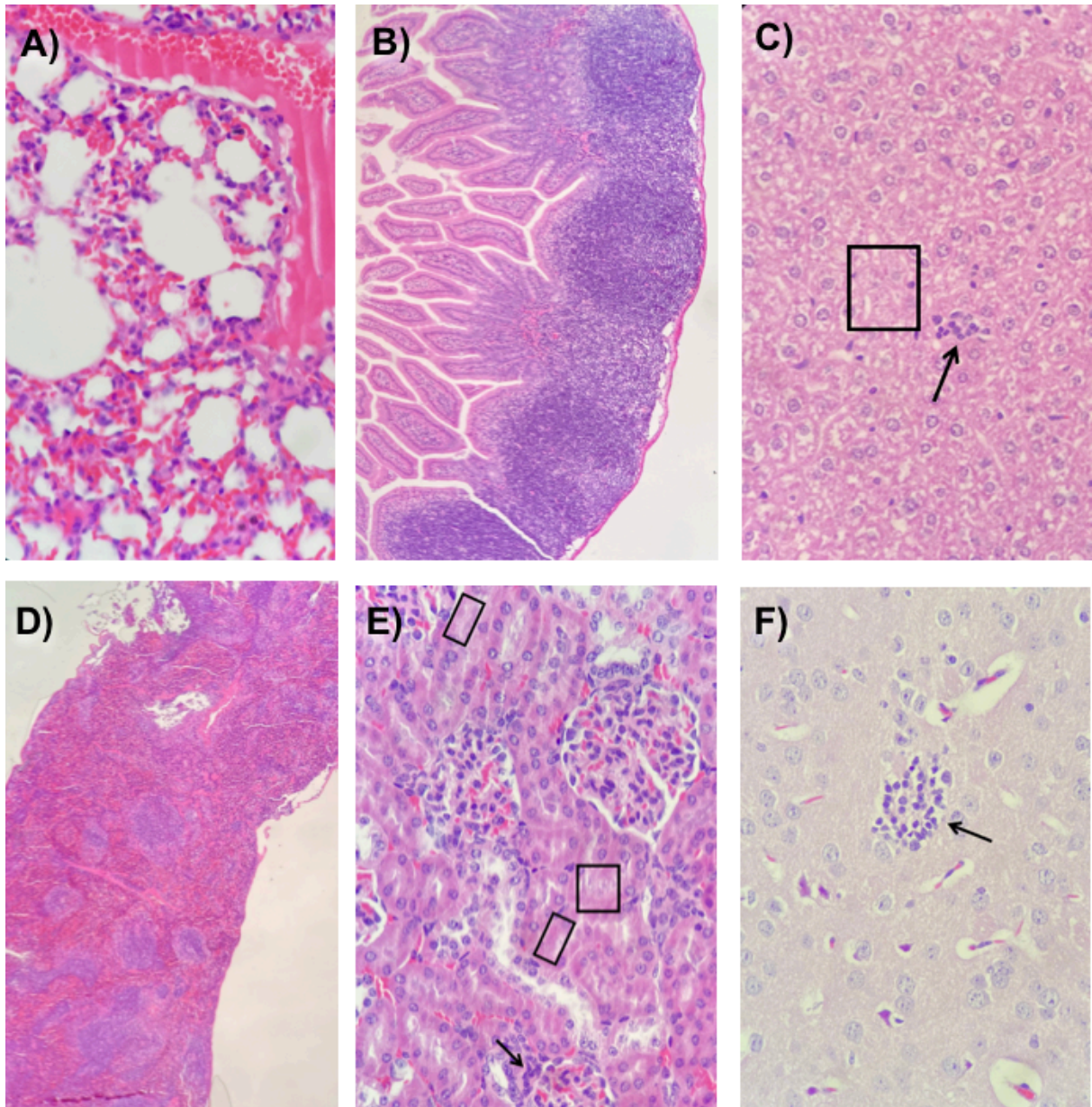


Figura 6.19. Cambios histopatológicos. Cortes histológicos representativos de las lesiones encontradas en los animales de los grupos 6, 7 y 8. A) Corte de pulmón que presenta neumonía; B) Infiltrado inflamatorio intersticial en intestino; C) En hígado se muestra necrosis coagultativa foca (recuadro) e infiltrado inflamatorio intersticial (flecha); D) Despoblación linfoide en bazo; E) Necrosis tubular aguda (recuadro) y glomerulitis (flecha); F) Encefalitis y foco de necrosis neuronal (flecha).

Los hallazgos histopatológicos y su severidad, se describen detalladamente por individuo y grupo experimental en el cuadro 6.4.

Hallazgos microscópicos y grado de severidad

Grupo	Órgano	Lesión	7 días post desafío				21 días post desafío			
			Centinela	Desafiados			Centinela	Desafiados		
			66	2	4	5	8	1	3	6
Grupo 1 E2e	Pulmón	Congestión	+	+	-	-	+	+	+	++
		Neumonía intersticial	+	++	+	++	-	+/++	+	++
		Hiperplasia BALT	+	-	-	+	-	-	-/+	+
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	+	+
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	-/+	-	-	-	-	-	-
	Hígado	Infiltrado inflamatorio intersticial	+	+	++	-/+	+	+	+	+
		Congestión	-	-	+	+	+	+	+	+
		Necrosis coagulativa	-	+	+	-/+	+	+/++	+	+
	Bazo	Congestión	-	-	-	-	-	++	+	+
		Despoblación linfoide	++	+/++	-/+	+	++	+	+	+
	Riñón	Congestión	-	-/+	-/+	+	-/+	+	+	+
		Necrosis tubular aguda	-	+	+	-	-	+	-	-
		Glomerulitis	+	-	+	-	-	+/++	-	++
		Nefritis	-	-	+	-	-	+/++	-	++
	Cerebro	Encefalitis	++	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis neuronal		-	-	-	-	-	-	-	-	
Gliosis		+	-	-	-	-	-	-	-	
Grupo 2 E2e + ISA 61 VG			16	9	11	14	47	10	12	
	Pulmón	Congestión	++	+	+	+	+	+	+	
		Neumonía intersticial	-/+	-/+	-/+	-	+	-/+	+	
		Hiperplasia BALT	-	-	-	-	-	-	+	
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	-	
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	-	+	-/+	+	-	-	
	Hígado	Infiltrado inflamatorio intersticial	+	-	-/+	-	+	-/+	-	
		Congestión	+	-	+	+	+	-/+	-	
		Necrosis coagulativa	+	-	-	-	-	-	+	
	Bazo	Congestión	-	-	-	-	-	+	+	
Despoblación linfoide		-/+	-	-	-	-	-	-		
Riñón	Congestión	+	-/+	+	+/++	-	-/+	-/+		
	Necrosis tubular aguda	-	-	-	-	-	-	-		
	Glomerulitis	+	-	-	-	-	-	-		

		Nefritis	+	-	-	-	-	-	-	
		Encefalitis	-	-	-	-	-/+	-	+	
	Cerebro	Necrosis neuronal	-	-	-	-	-/+	-	+	
		Gliosis	-	-	-	-	-	-	-	
Grupo 3 E2p			23	19	20	21	24	17	18	22
		Congestión	+	-	+	+	-/+	-/+	+	+
	Pulmón	Neumonía intersticial	+	-/+	+/++	+	-/+	+	-/+	+
		Hiperplasia BALT	-	-/+	-	-	-	+	-	-
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	-	++
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-/+	-	-	-/+	-	-	-	-
		Infiltrado inflamatorio intersticial	+	++/+++	-/+	-/+	+	++	+	-/+
	Hígado	Congestión	+	+	+	-/+	-/+	-/+	-/+	-
		Necrosis coagulativa	+	++	+	+	+	+	+	+
	Bazo	Congestión	-	+	+	-	-	+	+	+
		Despoblación linfoide	-	+	+	-	-	+	+	-/+
		Congestión	-/+	+	+	+	-/+	+	-/+	-/+
	Riñón	Necrosis tubular aguda	-	-	-	-	-	-	-	-
		Glomerulitis	-	-	-	-	-/+	+	-	+
	Nefritis	-/+	-	-	-	-	-	-	-	
	Encefalitis	-	+	-	-	-	-	-	-	
Cerebro	Necrosis neuronal	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Gliosis	-	-	+/++	-	-	-	-	-	
Grupo 4 E2p + poliactilamida			32	26	27	29	31	25	28	30
		Congestión	-	+	-	++	-/+	+	-/+	+
	Pulmón	Neumonía intersticial	+	+	+	++	+	+	+	+
		Hiperplasia BALT	-/+	-	-	-	-	-	-	-
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	-	-
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	-	-/+	++	+	-	-	++
		Infiltrado inflamatorio intersticial	+	+	+	+	-	-	+	-/+
	Hígado	Congestión	-/+	+	+	-	-/+	-	-	+
		Necrosis coagulativa	-/+	+	++	+	++	+	++	+
	Bazo	Congestión	-	-	-	-	-/+	+	+	+
	Despoblación linfoide	-	-	-	+	+	-	+	+	
	Congestión	+	+	+	+	+	-	+	-/+	
Riñón	Necrosis tubular aguda	-/+	-	-	-	-	-	+	+	
	Glomerulitis	+	-	-	-	-	-	-	+	

		Nefritis	-	-	-	-	-	-	-	-
		Encefalitis	-	++	+	+	+	-	+	+/++
	Cerebro	Necrosis neuronal	-	++	-	-	+	-	-	-
		Gliosis	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5 Vacuna comercial			40	33	35	36	39	34	37	38
		Congestión	+	+	+	-/+	+	++	-/+	-/+
	Pulmón	Neumonía intersticial	+/++	+/++	+	++	++	+	-/+	+
		Hiperplasia BALT	-	-	-	-	-	-	-	-
	Estómago	Hiperplasia GALT	-		-	-	-	-	-	-
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	+	-	+	-	+	-	-
		Infiltrado inflamatorio intersticial	-	+	+	+	+	-/+	-/+	-/+
	Hígado	Congestión	+	-	+	-	+	-/+	+	-/+
		Necrosis coagulativa	+	+	+/++	+/++	+	-/+	+	-/+
	Bazo	Congestión	-	+	-	+	+	+	+	+
		Despoblación linfoide	+	+	-/+	+	+/++	+	-/+	-/+
		Congestión	+	+	+	-	-/+	+	-/+	-
	Riñón	Necrosis tubular aguda	+	-	+	+	+	-	-	-
		Glomerulitis	-/+	-/+	-	-/+	-/+	-/+	+	-/+
	Nefritis	+	-	-	-	-	-	-	-	
	Encefalitis	+	+	-/+	+	+	+	-	-	
Cerebro	Necrosis neuronal	-	-	-	*	-	-	-	-	
	Gliosis	+	+	+	+/++	-/+	-	-	-/+	
Grupo 6 VDVB NADL			48	41	43	46	44	42	45	
		Congestión	+	+	+	+	+	+	+	
	Pulmón	Neumonía intersticial	+	+	-/+	+/++	+	+	+	
		Hiperplasia BALT	-	+	-	-/+	-	-	-/+	
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	-	
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	+/++	+	+++	+	+	+	
		Infiltrado inflamatorio intersticial	+	+	+	+	+	+	-/+	
	Hígado	Congestión	+	-	+	+	+	+	+	
		Necrosis coagulativa	++	+/++	+/++	+/++	+	+	+	
	Bazo	Congestión	+	+	+	+	+	+	+	
	Despoblación linfoide	+	++	+	+	-	+/++	+		
	Congestión	+	+	+	+	+	+	+		
Riñón	Necrosis tubular aguda	+	+	-	-/+	-/+	+	-		
	Glomerulitis	+	++	+	+	+	+/++	+		

	Nefritis	-	++	-	+	-	-	-		
	Cerebro	Encefalitis	-	+/++	+	+	+	++	+	
		Necrosis neuronal	-	+/++	++	-	-	+	-	
		Gliosis	+	+	+	-/+	+	-	+	
Grupo 7 SSF + ISA 61 VG		56	49	52	54	55	50	51	53	
	Pulmón	Congestión	+	+	+	+	+	+	+	-
		Neumonía intersticial	+	++	+/++	+	+/++	-/+	+	-/+
		Hiperplasia BALT	-	-/+	-	-/+	-	-	-/+	-/+
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	++	-	-	-/+	-	-
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	-/+	++	+	+	+++	-	+
	Hígado	Infiltrado inflamatorio intersticial	+	-/+	-	-/+	-/+	-	-	-
		Congestión	-/+	-/+	+	+	+	+	+	+
		Necrosis coagulativa	+	+/++	+	+	+	+	+	+
	Bazo	Congestión	+	+	+		+	-	-/+	+
		Despoblación linfoide	-/+	+	+		+	+	-/+	+
	Riñón	Congestión	+	-/+	+	-/+	+	+	+	+
		Necrosis tubular aguda	+	+	-/+	-/+	-/+	-	-/+	+
		Glomerulitis	+	+	+/++	+	+	+	+	+
		Nefritis	+	-	+	+/++	+	-/+	+	-/+
	Cerebro	Encefalitis	+	+	++	+	+/++	-	-	+
		Necrosis neuronal	-	+	+	-	+	-	-	+
		Gliosis	+	-/+	+	-	-/+	++	+/++	-/+
	Grupo 8 SSF + Poliacrilamida		63	57	61		64	60	62	
		Pulmón	Congestión	+	+	+		+	-/+	++
Neumonía intersticial			+	+/++	+		+	+	-	
Hiperplasia BALT			-/+	+	-		+	+	-	
Estómago		Hiperplasia GALT	-	-	-		-	-	-	
Intestino		Infiltrado inflamatorio intersticial	++	+++	+/++		++	+	+/++	
Hígado		Infiltrado inflamatorio intersticial	+/++	-/+	+		+	+	+	
		Congestión	+	+	-/+		+	+	+	
		Necrosis coagulativa	+	+	-/+		+	+	+	
Bazo		Congestión	+	+	+		+	+	-/+	
	Despoblación linfoide	+	+	-/+		+	+	+		
Riñón	Congestión	+	+	-/+		+	+	+		
	Necrosis tubular aguda	-/+	+	+		+	+	-/+		
	Glomerulitis	+	+	-/+		+	+	+		

		Nefritis	+	-	+		-	-	-	
	Cerebro	Encefalitis	-	-/+	+		+	+	+	
		Necrosis neuronal	-	-	+		-	-	+	
		Gliosis	+	-/+	+		-/+	-/+	-/+	
Grupo 9 SSF			13				15	70		
		Congestión	+				-/+	+		
	Pulmón	Neumonía intersticial	+				-/+	-		
		Hiperplasia BALT	-				-	-		
	Estómago	Hiperplasia GALT	-				-	-		
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-/+				-/+	-		
		Infiltrado inflamatorio intersticial	-				-	-		
	Hígado	Congestión	-/+				+	-/+		
		Necrosis coagulativa	-				-	-		
	Bazo	Congestión	-				-	-		
		Despoblación linfoide	-				-	-		
		Congestión	-				+	-/+		
	Riñón	Necrosis tubular aguda	-				-	-		
		Glomerulitis	-				-	-		
	Nefritis	-				-	-			
	Encefalitis	-				-	-			
Cerebro	Necrosis neuronal	-				-	-			
	Gliosis	-				-	-			

Cuadro 6.4. Resultados de Histopatología. Resumen de las lesiones asociadas a la infección por el VDVB indicando el nivel de severidad de la lesión (escala de colores) en cada órgano de cada animales de los 9 grupos experimentales.

6.9 Inmunohistoquímica

Al igual que en la histopatología, para la IHQ se evaluaron cortes de cerebro, pulmón, estómago, hígado, bazo, intestino y riñón del total de los animales incluidos en este estudio con la finalidad de detectar la presencia del antígeno viral del VDVB en los tejidos mencionados.

Por medio de la IHQ se evidenció inmunopositividad en los tejidos evaluados; sin embargo, el inmunomarcaje tuvo variaciones dependiendo del grupo experimental analizado. Similar al apartado anterior, se tomó como referencia la positividad obtenida en los grupos 6, 7 y 8, utilizados como grupos control de la infección del VDVB cepa NADL en los ratones experimentales (Fig. 6. 20).

El nivel de inmunopositividad se clasificó como incipiente (-/+), leve (+), moderado (++) , moderado/severo (+++/+++) y severo (+++); así mismo se agregó la siguiente escala de colores para facilitar la visualización de los resultados:

Incipiente	Leve	Moderado	Moderado/Severo	Severo
-/+	+	++	++/+++	+++

La detección por IHQ del antígeno del viral asociado a lesiones causadas por infección del VDVB y su distribución en cada órgano y el nivel de la inmunopositividad, se describen detalladamente por individuo y grupo experimental en el cuadro 6.5.

El efecto inmune protector, contra el VDVB, desencadenado por cada uno de los tratamientos fue evaluado con base en los puntajes determinados en la IHQ. Mediante ésta técnica el VDVB fue detectado en pulmón, estómago, intestino, hígado, bazo, riñón y cerebro en los grupos utilizados como testigo positivo (grupo 6, 7 y 8). De la misma forma que en los resultados mostrados en la RT-PCR, VNT's e histopatología, en el grupo 2, se redujo significativamente el marcaje del antígeno viral, lo cual sugiere una disminución en la capacidad replicativa del virus a los 7 y 21 días post desafío. Los resultados de RT-PCR, histopatología e IHQ coinciden en los animales 9 y 10; en donde

todos los órganos del ratón 9 resultaron negativos por IHQ y solo positividad leve en hígado del ratón 10. Al igual que el ratón 9, en este grupo el ratón identificado como 47 mostró negatividad completa en los órganos evaluados lo cual confirma que al utilizar E2e+ISA VG 61 se disminuye la infección por el VDVB.

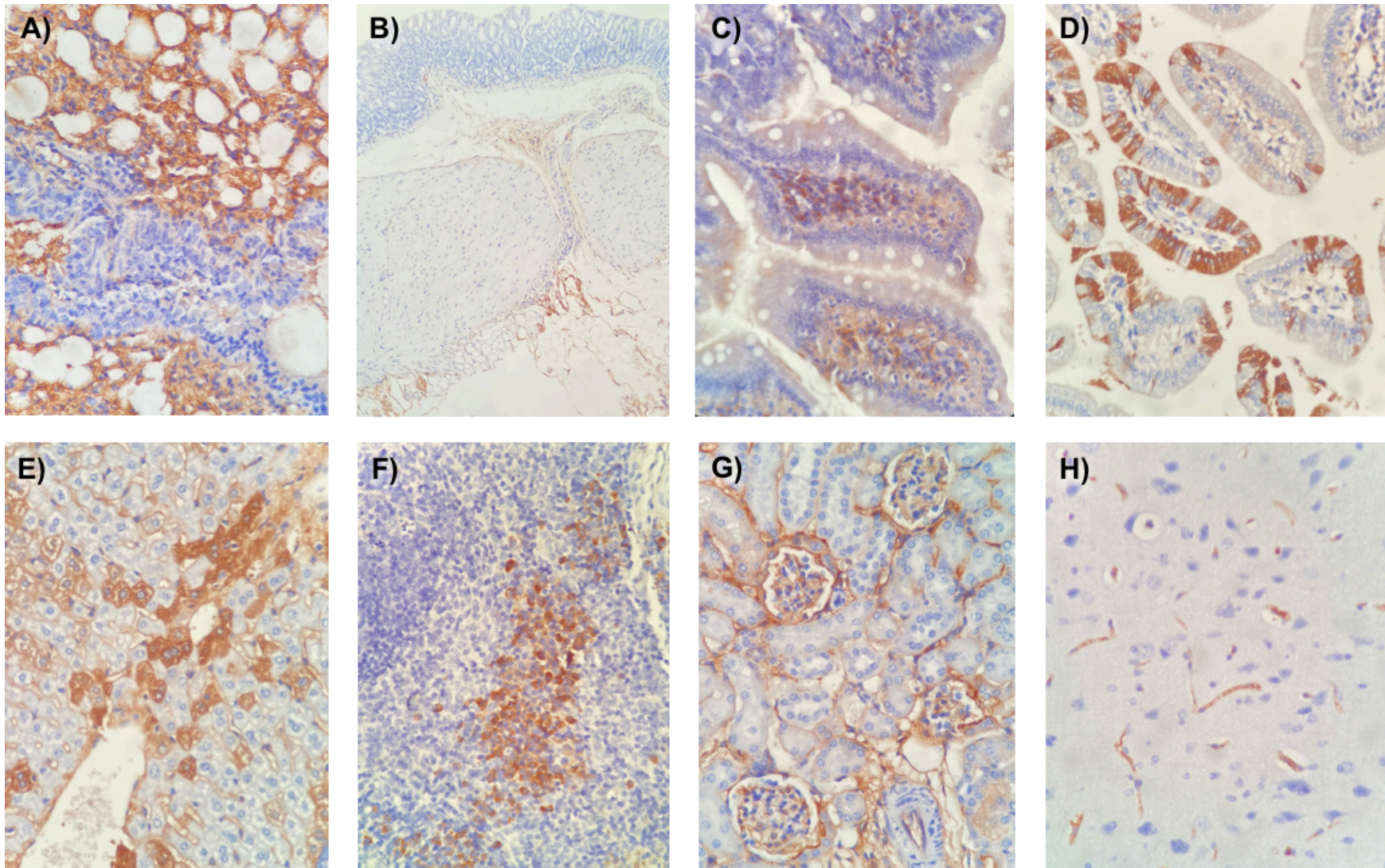


Figura 6.20. Inmunohistoquímica para la detección del VDV. Las imágenes corresponden a los órganos de ratón sometidos a IHQ, en donde se muestra la distribución del antígeno viral por inmunopositividad (coloración café). A) Pulmón; B) Estómago; C) y D) Intestino; E) Hígado; F) Bazo; G) Riñón; H) Encéfalo.

Nivel de inmunopositividad por IHQ

Grupo	Órgano	Lesión	7 días post desafío				21 días post desafío		
			Centinel a	Desafiados			Centinel a	Desafiados	
			66	2	4	5	8	1	3
Grupo 1 E2e	Pulmón	Neumonía intersticial	+	+	+	+	+	++/++	++/++
		Hiperplasia BALT	+++	-	-	-	-	-	-
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	+	-	-	++/++	+
		Capilares/membrana de capilares	-	-	-	-	-	++	++
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	-	-	-	+++	++	+
		Enterocitos	-	-	+/++	-	-	-	-
	Hígado	Necrosis coagulativa	++	+++	+++	++	+	++	++
		Sinusoides	-	-	-	-	+	-	+
	Bazo	Despoblación linfocitaria	+	-	+++	-/+	+++	-	++/++
	Riñón	Necrosis tubular aguda	-	-	+++	+	-	-	+
Glomerulitis		-	+	+	-	-	-	-	
Cerebro	Membranas endoteliales	-	++/++	++	++	-	+	++	
Grupo 2 E2e + ISA 61 VG			16	9	11	14	47	10	12
	Pulmón	Neumonía intersticial	-/+	-/+	-/+	-/+	-	-	-/+
		Hiperplasia BALT							-/+
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	-
		Capilares/membrana de capilares	-	-	-	-	-	-	-
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	-	-	-	-	-	+
		Enterocitos	-	-	-	-	-	-	-
	Hígado	Necrosis coagulativa	+	-	-	-	-	+	+
		Sinusoides	-	-	-	-	-	-	-
	Bazo	Despoblación linfocitaria	-	-	-	++	-	-	-/+
Riñón	Necrosis tubular aguda	-	-	-	-	-	-	-	
	Glomerulitis	-	-	-	-	-	-	-	
Cerebro	Membranas endoteliales	-	-	-	+	-	-	-/+	
Grupo 3 E2p			23	19	20	21	24	17	18
	Pulmón	Neumonía intersticial	+	++	++	-/+	-/+	++	+
		Hiperplasia BALT	-	-	-	-	-	-	-
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	+++	-	-	-	-
		Capilares/membrana de capilares	-	-	-	-	-	++	-
Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-/+	-	-/+	-	-	++	-/+	

		Enterocitos	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hígado	Necrosis coagulativa	+	+	+	+	+	++	+	++
		Sinusoides	-	-	-	-	-	-	+	++
	Bazo	Despoblación linfoide	-	-	-	-	-	-	-	-
	Riñón	Necrosis tubular aguda	-/+	-	+	-/+	-	-	+	-
		Glomerulitis	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cerebro	Membranas endoteliales	+	++	+	++	+	++	+	++
Grupo 4 E2p + poliacrilamida			32	26	27	29	31	25	28	30
	Pulmón	Neumonía intersticial	+	-/+	+	+	+	-/+	+	+
		Hiperplasia BALT	-	-	-	-	-	-	-	-
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	-	-
		Capilares/membrana de capilares	-	-	-	-	+	-	-	+
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	-	-	-	-/+	-	+	++
		Enterocitos	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hígado	Necrosis coagulativa	-/+	+	-	-	++	+	++	+
		Sinusoides	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bazo	Despoblación linfoide	-	-	-/+	-	++	-	++	++
Riñón	Necrosis tubular aguda	-/+	-	-	-	-	-	-/+	+	
	Glomerulitis	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cerebro	Membranas endoteliales	+	+	-/+	+	+	-/+	++	+	
Grupo 5 Vacuna comercial			40	33	35	36	39	34	37	38
	Pulmón	Neumonía intersticial	+	+/++	+/++	+/+	+	+++	++	++
		Hiperplasia BALT	-	-	-	-	-	-	-	-
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	-	-
		Capilares/membrana de capilares	-	-	*	*	+	+	++	+
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	-/+	-/+	-/+	+	+	+/++	-
		Enterocitos	-	-	-	-	-	+	-	-
	Hígado	Necrosis coagulativa	+	++	++	+	+	++	++/++	++
		Sinusoides	+	-	-/+	+	-	++	++	++
	Bazo	Despoblación linfoide	+	+	-/+	+	+	++	++	++
Riñón	Necrosis tubular aguda	-/+	+	-	+	+	+/++	++/++	++/++	
	Glomerulitis	-/+	+	-	+	+	+/++	++/++	++/++	
Cerebro	Membranas endoteliales	+	+/++	-/+	++	++	++/++	++	++	
Grupo 6			48	41	43	46	44	42	45	
	Pulmón	Neumonía intersticial	+	+	+	+	+	++	++	
	Hiperplasia BALT	-	-	-	-	-	-	-		

	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	-	-
		Capilares/membrana de capilares	-	-	-	-	-	+	-/+	
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	-/+	-	-	-/+	++	+	
		Enterocitos	-	-	-	-	-	-	-	
	Hígado	Necrosis coagulativa	+	+	+	+	++/+++	++/+++	++	
		Sinusoides	+	-	-	-	-	-	-	
	Bazo	Despoblación linfocitaria	-/+	-	-	-	++	++	++/+++	
Riñón	Necrosis tubular aguda	-	-	-	-	+	-	+		
	Glomerulitis	-	-	-	-	-	-	-		
Cerebro	Membranas endoteliales	+	+	+	++	++	++	++		
Grupo 7 SSF + ISA 61 VG			56	49	52	54	55	50	51	53
	Pulmón	Neumonía intersticial	-/+	+	+	+	++	+	+	++/+++
		Hiperplasia BAL	-	-	-	-	-	-	-	+
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-	-	-	-	-	-
		Capilares/membrana de capilares	-	-	+	-	+	+	+	+++
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-	++	-/+	-	++/+++	++	++	+++
		Enterocitos	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hígado	Necrosis coagulativa	+/++	-/+	++	+	++	++	++	++
		Sinusoides	-	-	+	-	++	-	-	+
	Bazo	Despoblación linfocitaria	-	-	-/+	+	++/+++	++	++	++/+++
Riñón	Necrosis tubular aguda	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Glomerulitis	-	-/+	-	-/+	+	+	+	++	
Cerebro	Membranas endoteliales	++	+	++	+	++	++	++	+++	
Grupo 8 SSF + Poliacrilamida			63	57	61		64	60	62	
	Pulmón	Neumonía intersticial	+	+	+		+	+	+	
		Hiperplasia BAL	-	-	-		-	-	-	
	Estómago	Hiperplasia GALT	-	-	-		-	-	-	
		Capilares/membrana de capilares	-	+	-/+		-/+	+	-	
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	+	+	-		+	+	-	
		Enterocitos	-	-	-		-	-	-	
	Hígado	Necrosis coagulativa	++	+	++		++	+	-	
		Sinusoides	-	-	-		-	-	-	
	Bazo	Despoblación linfocitaria	++/+++	++/+++	++		++	+	-	
Riñón	Necrosis tubular aguda	-	-	-		-	-	-		
	Glomerulitis	+	+	+		+	-	-		
Cerebro	Membranas endoteliales	++	+	++		+	+	++		

		13		15	70		
Grupo 8 SSF + Poliacrilamida	Pulmón	Neumonía intersticial	-		-	-	
		Hiperplasia BALT	-		-	-	
	Estómago	Hiperplasia GALT	-		-	-	
	o	Capilares/membrana de capilares	-		-	-	
	Intestino	Infiltrado inflamatorio intersticial	-		-	-	
		Enterocitos	-		-	-	
	Hígado	Necrosis coagulativa	-		-	-	
		Sinusoides	-		-	-	
	Bazo	Despoblación linfoide	-		-	-	
	Riñón	Necrosis tubular aguda	-		-	-	
	Glomerulitis	-		-	-		
Cerebro	Membranas endoteliales	-		-	-		

Cuadro 6.5 Resultados de la Inmunohistoquímica. Se indican los órganos positivos al VDVB por IHQ y el nivel de intensidad (escala de colores) en inmunopositividad para cada uno de los grupos experimentales.

6.9.1 Evaluación de la eficacia protectora inducida por la proteína recombinante E2

Con el objetivo de evidenciar la protección conferida por la administración de los diferentes tratamientos en los 9 grupos experimentales; por medio de IHQ, se evaluó la presencia de antígeno del VDVB en tejidos murinos por los cuales tiene tropismo.

El antígeno del VDVB fue detectado en la mayoría de los órganos sometidos a revisión; sin embargo, el inmunomarcaje fue variable entre grupos. Los grupos 6, 7 y 8 utilizados como testigos positivos evidenciaron la presencia del VDVB en pulmón, estómago, intestino, hígado, bazo, riñón y cerebro; no obstante, en el caso de estómago y cerebro la inmunopositividad se demostró en el endotelio capilar de cada órgano y no asociado a las lesiones tisulares asociadas a la infección por el VDVB. Por el contrario, el grupo 9 al ser grupo testigo negativo, no se detectó el antígeno viral en ninguno de los órganos antes mencionados.

Se analizaron y se compararon, por separado, los datos obtenidos de los animales sometidos a necropsia 7 días y 21 días post desafío. En ambos periodos de tiempo, los órganos que permitieron observar diferencias estadísticas entre grupos tratados fueron pulmón, hígado, riñón y cerebro. Por el contrario, los resultados de la IHQ obtenidos a partir de la evaluación de estómago, intestino y bazo no generan diferencia entre grupos.

En la figura 6.21 se resumen los resultados de la IHQ de los ratones sacrificados 7 días post desafío, en donde se observa una disminución en la detección del VDVB en pulmón e hígado de los ratones inmunizados con E2e+ISA 61 VG (grupo 2) en comparación con órganos de animales testigo (grupo 7) y animales inmunizados con la vacuna comercial (grupo 5). En contraste, en los animales inmunizados con la proteína recombinante E2e, E2p, E2p+poliacrilamida y vacuna comercial (grupos 1, 3, 4 y 5, respectivamente) se detectó inmunopositividad mayor o similar a los grupos control positivo (grupos 6, 7 y 8). (Figura 6.21)

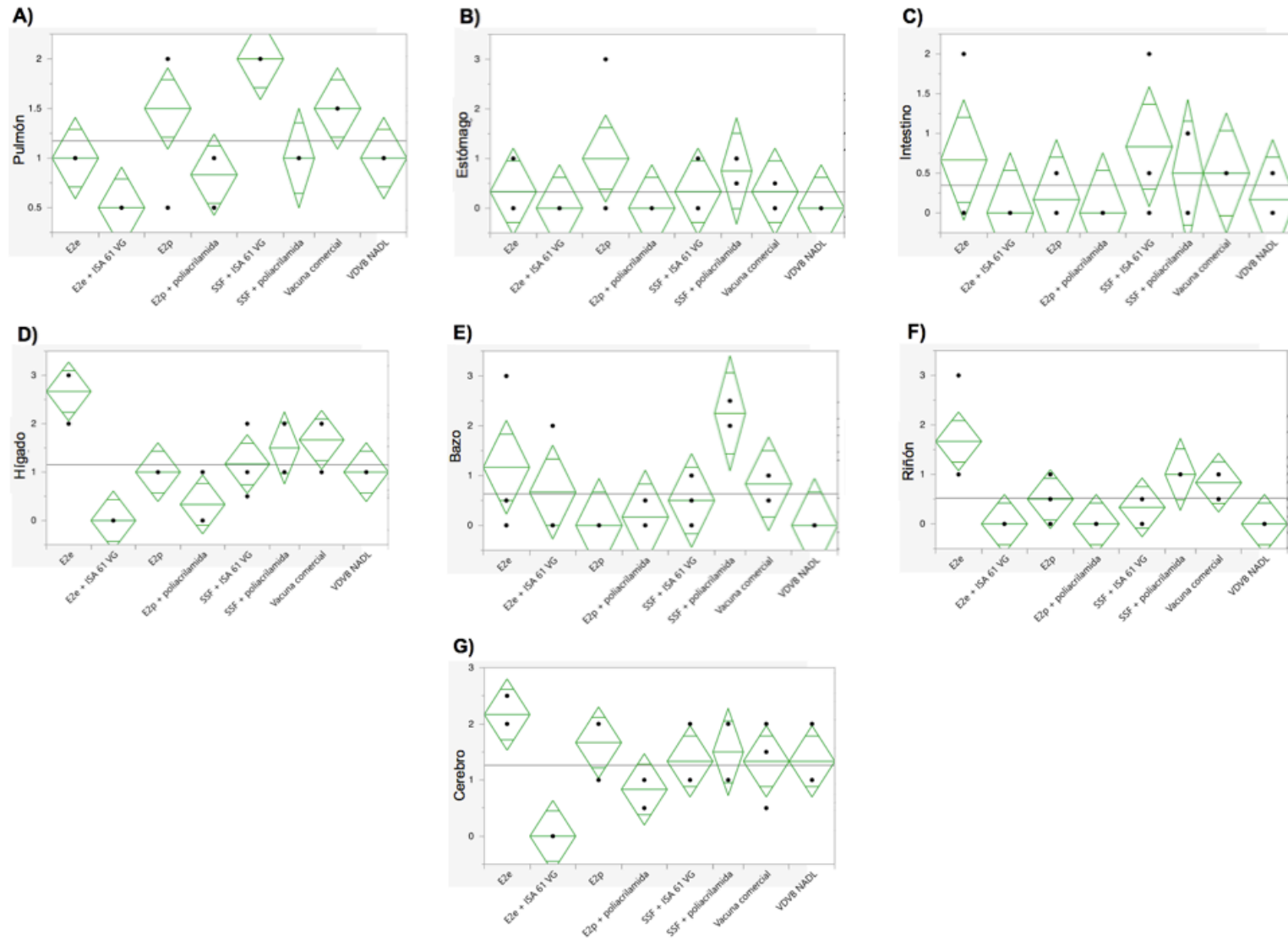


Figura 6.21. Resultados de la IHQ 7 días post desafío. En la gráfica se muestran la comparación entre grupos de los puntajes asignados en la IHQ en animales sometidos a necropsia 7 días post desafío

Por otro lado, en el caso de animales evaluados 21 días después del desafío el grupo 2 mostró menor inmunomarcaje en pulmón, hígado, riñón y cerebro con respecto a los mismos tejidos del grupo 6 (testigo positivo) y el inmunizado con la vacuna comercial. Así mismo, en los grupos experimentales a los que se les administró la proteína recombinante E2e, E2p, E2p+poliacrilamida y vacuna comercial (grupos 1, 3, 4 y 5, respectivamente) mostraron diferencias relevantes en inmunopositividad en comparación con los grupos control positivo (grupos 6, 7 y 8). (Figura 6.22)

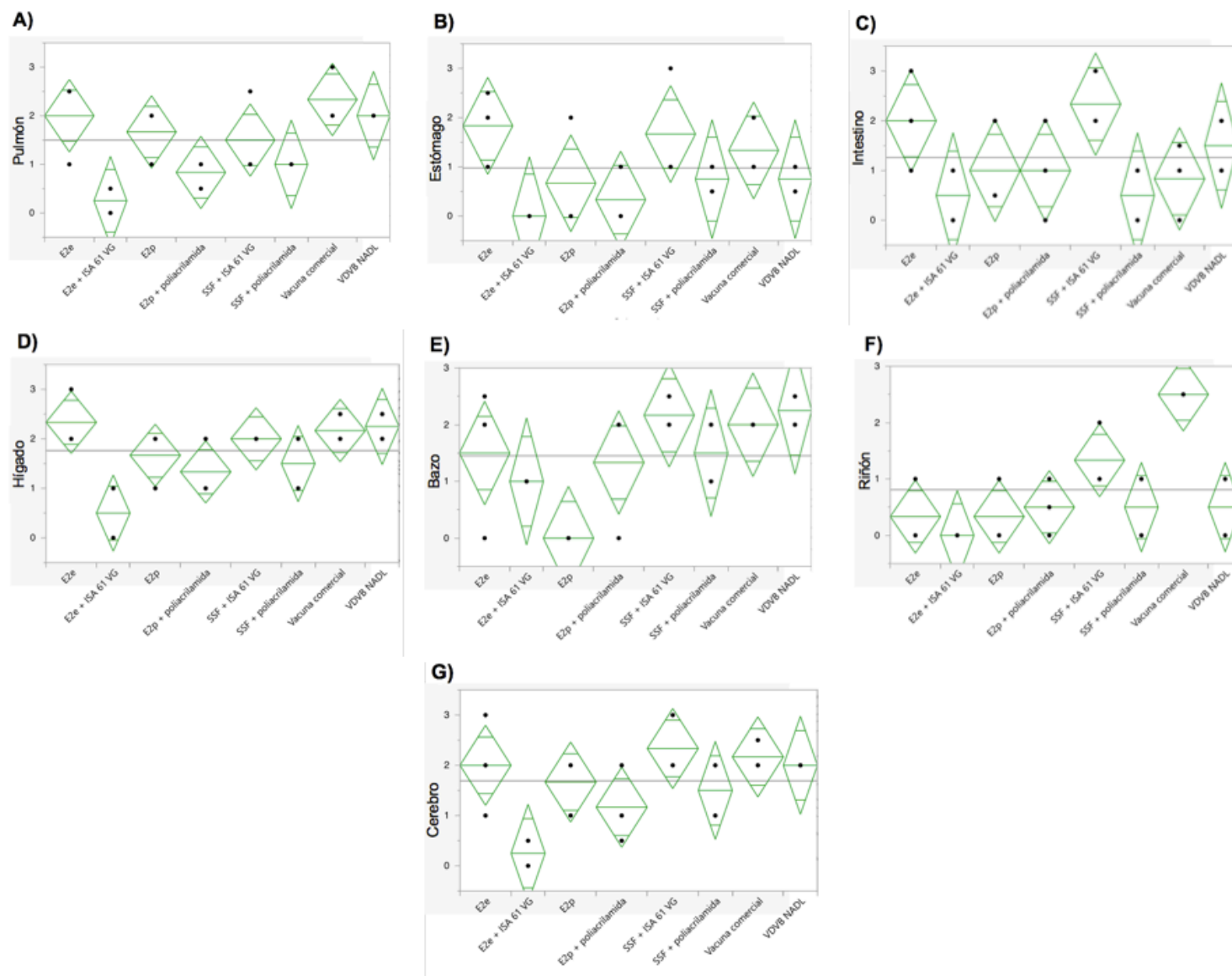


Figura 6.22. Resultados de la IHQ 21 días post desafío. En la gráfica se muestran la comparación entre grupos de los puntajes asignados en la IHQ en animales sometidos a necropsia 21 días post desafío.

7. Discusión

El VDVB es probablemente el agente viral más importante a nivel mundial en rumiantes; por lo tanto, la DVB continúa siendo una enfermedad prevalente en la mayoría de las poblaciones bovinas domésticas (Neill, 2013). El VDVB es el responsable por generar una compleja combinación de presentaciones clínicas que derivan en pérdidas económicas importantes a la industria ganadera de leche y carne de bovinos. De la misma forma, la infección por VDVB en cerdos, pequeños rumiantes, y rumiantes de vida silvestre resulta en presentaciones clínicas similares a las causadas en bovinos; por lo tanto, el contacto interespecies facilita la transmisión viral y favorece su prevalencia en diversas poblaciones animales (Gómez-Romero *et al.*, 2021).

Lo anterior, resalta la necesidad de desarrollar e implementar medidas de control de la DVB que permitan disminuir las pérdidas asociadas infecciones causadas por el VDVB, así como limitar y prevenir infecciones por agentes oportunistas en eventos de inmunosupresión causados por el VDVB (Chase *et al.*, 2004). De forma convencional, en México la prevención de la DVB se basa en la aplicación voluntaria de vacunas, de virus activo modificado y virus inactivado (Gómez-Romero *et al.*, 2021a).

Si bien, tanto las vacunas de virus activo modificado como las de virus inactivo, pueden conferir protección contra la DVB, es crucial considerar las desventajas al usar este tipo de inmunógenos; tales como inmunosupresión, contaminación con VDVB de campo, la potencial reversión de la virulencia o el desarrollo de la pancitopenia neonatal bovina y la necesidad de continuos refuerzos vacunales (Ridpath, 2013; Palomares *et al.*, 2013; Gómez-Romero *et al.*, 2021b; Reber *et al.*, 2006; Rodning *et al.*, 2010; Deutskens *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior, en los últimos años se ha realizado la búsqueda de nuevas alternativas para el control de la DVB mediante el uso de diversos tipos de inmunógenos que sean más seguros y eficaces para evitar la problemática antes mencionada; acorde con esto, en el presente trabajo, se sintetizó la proteína E2 del VDVB-1a recombinante

expresada en bacterias y células eucariontes con la finalidad de evaluarlas como candidatos vacunales contra la DVB en un modelo murino.

Debido a las características inmunogénicas que tiene a glicoproteína integral de la membrana E2, la hacen el blanco ideal y potencial para el desarrollo de nuevas vacunas contra el VDVB que pueda ser útil como una herramienta en la prevención y control de la DVB (Deregt *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2003; Donis *et al.*, 1988).

Con propósitos vacunales, la glicoproteína E2, ha sido expresada en sistemas heterólogos como: baculovirus (Chimeno *et al.*, 2007), partículas replicativas basadas en alphavirus (Loy *et al.*, 2003), herpesvirus bovino (Donofrio *et al.*, 2008) y equino (Rosas *et al.*, 2007) virus de estomatitis vesicular (Kohl *et al.*, 2007), así como en células de mamífero (Thomas *et al.*, 2009); además, el gen que codifica para la proteína E2 se ha utilizado en inmunizaciones con DNA (Donofrio *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de protección contra la infección del VDVB en un modelo murino, utilizando la proteína E2 recombinante del VDVB, sintetizada en dos sistemas de expresión. En estudios previos, el modelo murino ha sido utilizado como modelo de infección con el VDVB. La capacidad replicativa que tiene el VDVB en diversos tejidos del ratón (Seong *et al.*, 2015) ha permitido sugerirlo como un modelo potencial para la evaluación de la calidad de vacunas experimentales elaboradas con este virus; lo anterior ofrece una alternativa de evaluación de vacunas para bovinos en una especie con mayor viabilidad de mantenimiento, manejo e inversión de recursos económicos (Reyes-Montellano *et al.*, 2020).

Debido a lo anterior, se realizó la inmunización de 8 grupos experimentales; de los cuales, el grupo 1 y 2 fueron inmunizados con diferentes formulaciones de la proteína E2 recombinante producida en células eucariontes (E2e), el grupo 3 y 4 con diferentes formulaciones de la proteína E2 producida en bacteria (E2p), el grupo 5 fue inmunizado con una vacuna comercial de virus activo, el grupo 6 fue inoculado con la cepa NADL del VDVB, mientras que los grupos 7 y 8 fueron utilizados como controles negativos de

inmunización y desafío, al ser inoculados con SSF con ISA VG 61 y poliacrilamida, respectivamente. Por lo tanto, los grupos 5-8 fueron utilizados como grupos experimentales comparativos, en donde el grupo 5 nos permitió comparar la respuesta protectora de una vacuna comercial con las inducidas por las formulaciones de proteínas E2 recombinantes, y el grupo 6 fue utilizado como control positivo de la infección con el VDVB, por lo que los resultados obtenidos se contrastaron con los obtenidos en animales inmunizados.

Los resultados obtenidos en la RT-PCR a partir de órganos de ratones de cada grupo experimental, indicaron que los grupos 3, 5, 6, 7 y 8 fueron similares con base en el porcentaje de positividad al genoma del VDVB en los órganos evaluados; esto quiere decir que la detección del genoma del VDVB en éstos grupos fue equiparable. Por otro lado, los grupos 1 y 4 tuvieron menor positividad en la prueba.

Por el contrario, el grupo 2 (inmunizados con E2e+ISA VG 61) fue el único en el que se obtuvieron un mayor número de muestras negativas, lo que sugiere una reducida infectividad y replicación del VDVB en este grupo. De manera interesante, en dos ratones pertenecientes al grupo 2 se obtuvieron resultados negativos en todos los tejidos, lo cual podría sugerir que en ambos animales la infección con el VDVB fue bloqueada en medida importante al usar dicho inmunógeno; estos resultados coinciden con los obtenidos en histopatología e IHQ en donde los animales fueron negativos a lesiones e inmunomarcaje.

La detección del genoma del VDVB en óLa evaluación de animales centinelas por RT-PCR sugiere que el virus es capaz de transmitirse por fómites o secreciones; sin embargo, estos no pudieron ser identificados en este estudio. Lo anterior, evidenciado por la detección del genoma del VDVB en los ratones centinelas de todos los grupos experimentales; a excepción del grupo 2 en donde el animal identificado con el número 16 resultó negativo por RT-PCR.

El nivel de anticuerpos producido después de una inmunización es un criterio

importante que nos permite evaluar la eficacia de la vacuna experimental, ya que se ha descrito que títulos de anticuerpos neutralizantes mayores o iguales a 1:256 son necesarios para evitar la presentación clínica causada por la infección del VDVB (Bolin *et al.*, 1995). En contraste, estudios realizados por Beer *et al.*, estimaron que el título protector contra el VDVB es de 1:512 (Beer *et al.*, 2000). Considerando los resultados de ambos estudios, el nivel más bajo sugerido para tener protección frente a infecciones causadas por VDVB en bovinos es de 1:256. Es decir, se requiere una dosis neutralizante de 1:256 para proteger a animales susceptibles contra la infección por el VDVB.

La respuesta humoral en nuestro esquema experimental se midió por medio de la titulación de anticuerpos neutralizantes, en donde se observaron diferencias en el nivel de anticuerpos producidos por los grupos 1 y 2 los cuales se elevaron a partir de la primera aplicación hasta un título de 1:8 y 1:128, respectivamente en comparación con los grupos testigo; de la misma forma, los animales de dichos grupos experimentales mantuvieron un incremento considerable durante los 79 días posteriores alcanzando títulos de hasta 4096 y 16384, respectivamente. Sin embargo, la actividad por anticuerpos neutralizantes en los grupos 3 y 4 fue únicamente detectable en la parte final del ensayo en donde el grupo 3 alcanzó un título de 1:16, mientras que el grupo 4 alcanzó un título de 1:8 al día 79 del ensayo y posteriormente al día 94 los anticuerpos neutralizantes fueron indetectables. El título de neutralización viral (VNT) estimado de los animales del grupo 2, en etapas tempranas del experimento, podría estar relacionado con la disminución de lesiones patológicas, así como una disminuida capacidad de replicación del VDVB en los órganos evaluados, evidenciado en los resultados de la IHQ.

Los animales inmunizados con la vacuna comercial no serocovirtieron en ninguno de los tiempos del muestreo; en contraste con estudios previos en donde la la detección de anticuerpos neutralizantes en bovinos es detectada desde los 15 días post inmunización con vacunas inactivadas (Alpay y Yesilbag, 2019) y 21 días post inoculación con vacunas de virus atenuado (Sangewar *et al.*, 2020). La vacuna

comercial está diseñada para su uso en bovinos; por consiguiente, puede esperarse una respuesta diferente a la generada en ratones. La formulación no promovió una respuesta humoral en los periodos considerados para evaluación; sin embargo, una respuesta posterior a este periodo no debe descartarse.

Es importante mencionar que en muestras de suero de animales centinela de todos los grupos no se detectó actividad neutralizante por anticuerpos durante toda la fase experimental, mostrando una respuesta similar a los grupos 6, 7 y 8; esto puede deberse a que la exposición con el VDVB, eliminado por los animales desafiados, no fue el suficiente para generar una respuesta por anticuerpos detectables.

En los grupos 6, 7 y 8 utilizados como grupos testigos positivos no fue posible la detección de anticuerpos neutralizantes en la dilución inicial 1:4 empleada en la prueba. Estos resultados se mantuvieron hasta el día 21 post desafío en donde los niveles de anticuerpos fueron indetectables. Lo anterior, coincide con lo reportado por Cai *et al.*, en donde el VNT de animales desafiados se mantuvieron en niveles bajos en comparación con animales inmunizados con vacunas de DNA y subunitarias contra el VDVB (Cai *et al.*, 2018). Similar a los grupos mencionados, los animales del grupo 9 inmunizados únicamente con SSF sin desafiar, no montaron una respuesta humoral contra el VDVB.

De manera subsecuente, la evaluación histopatológica realizada en cada grupo experimental reveló que los órganos de los animales vacunados con E2e+ISA VG 61, al igual que los centinelas, mostraron una evidente disminución de las lesiones mencionadas, a los 7 y 21 días post desafío en comparación con los demás grupos inmunizados ya sea con la proteína E2e sin adyuvante, E2p o la vacuna comercial. Adicionalmente, fue el único grupo en donde los animales inmunizados no presentaron despoblación alteraciones en bazo, ni lesiones a nivel renal. Por otro lado, un hallazgo importante fue que en los animales inmunizados del grupo 1 (E2e) no se encontró lesión a nivel neurológico, un evento que no se observó en ninguno de los grupos experimentales sometidos a inmunización.

Por otro lado, el efecto inmune protector, contra el VDVB, desencadenado por cada uno de los tratamientos fue evaluado con base en los puntajes determinados en la IHQ. Similar a los resultados obtenidos en RT-PCR, VNT's e histopatología, en la IHQ la disminución en la detección del antígeno del VDVB puede ser atribuible a la formulación utilizada en el grupo 2, en donde el uso de la proteína recombinante E2e emulsionada con el adyuvante Montanide ISA VG 61, desencadena una respuesta inmunitaria temprana que puede impedir el desarrollo de lesiones, o en su defecto, una disminución en la gravedad de las mismas. Esto coincide con estudios previos en donde este tipo de adyuvantes ha sido utilizado, en vacunas de ADN y subunitarias, para estimular respuestas inmunitarias más sólidas contra el VDVB (Cai *et al.* 2018; Pecora *et al.*, 2015).

Por el contrario, el aumento en la inmunoposividad de los tejidos en los grupos 1, 3, 4 y 5, evidencia una mayor capacidad de replicación del VDVB y, por lo tanto, una disminución en la capacidad de inducción de protección al utilizar los respectivos tratamientos. En estos grupos la positividad en tejidos fue similar entre animales inmunizados en relación con los ratones centinela.

Los hallazgos de este estudio y los obtenidos por Reyes-Montellano *et al.*, 2020, que pertenecen al mismo grupo de trabajo, son los primeros en evidenciar la transmisión entre ratones infectados con el VDVB a ratones susceptibles. Lo cual tiene importantes implicaciones en el entendimiento de la patogenia del VDVB, no sólo en ratones, si no también en bovinos, ya que los ratones podrían fungir como reservorios del virus y así favorecer la propagación del VDVB entre especies.

Los hallazgos del presente estudio sugieren que la formulación de la proteína recombinante E2e + ISA 61 puede ser considerada como un candidato vacunal potencial para el control de la DVB. Se requiere realizar experimentos de vacunación y desafío en bovinos para evaluar el nivel de protección conferido en la especie destino, así como determinar si promueve protección cruzada contra otras cepas del VDVB.

8. Conclusiones

- Se realizó la construcción y expresión de la proteína recombinante E2 del VDVB en dos sistemas de expresión: bacterias y células eucariontes y se demostró su capacidad antigénica.
- Los órganos evaluados de los grupos 1-5 tuvieron daño a diferentes grados, en donde los ratones inmunizados con la proteína recombinante E2e + ISA VG 61 demostraron menor daño en comparación con los demás grupos experimentales.
- El uso de la proteína E2e, expresada en células eucariontes, aunada a la actividad del adyuvante Montanide ISA VG 61 induce una respuesta inmunológica que reduce los daños causados por la infección del VDVB, demostrada por la prevención de lesiones y disminución en la transmisión del virus a animales centinela.
- La formulación de la proteína E2e con el adyuvante indujo una mejor respuesta inmunitaria, lo cual confiere un mejor efecto protector ante la infección por el VDVB que al utilizar la proteína recombinante E2e por sí sola.
- La proteína recombinante E2e emulsionada con adyuvante representa un potencial candidato a vacuna, a ser evaluado en bovinos, para ser considerado como herramienta en la prevención y control de la DVB.

9. Prospectiva

- Realizar una caracterización de la respuesta inmune celular inducida por el uso de la formulación E2e + ISA VG 61.
- Evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes en periodos más prolongados
- Incluir en el análisis mayor número de animales sometidos por grupo experimental
- Evidenciar respuesta humoral, celular y respuesta inmune protectora contra la

formulación E2e + ISA VG 61 en bovinos

10. Referencias

- [ACUERDO] mediante el cual se enlistan las enfermedades y las plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. [Word: 20 de septiembre de 2007] Ciudad de México. DOF. http://dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=5001157. [consulta: marzo de 2017]
- Agapov EV, Murray CL, Frolov I, Qu L, Myers TM, Rice CH M.** 2004. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoeavirus. *J. Virol.* 78: 2414-2425.
- Agnello V, Ábel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX.** 1999. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 12776-12771.
- Alpay G, Yesilbag K.** 2019. Neutralizing antibody titers against field strains of bovine viral diarrhoea virus after vaccination with three commercial vaccines. *Turk J Vet Anim Sci.* 43: 716-723. doi:10.3906/vet-1803-43.
- Bachofen C, Stalder H, Braun U, et al.** 2008. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Vet Microbiol* 131(1-2):93-102.
- Baker JC.** 1987. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J Am Vet Med Assoc.* 190: 1449-1458.
- Baker JC.** 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am.* 11 (3):425-445.
- Bastian M, Holsteg M, Hanke-robinson H, Duchow K, Cussler K.** 2011. Bovine neonatal pancytopenia: is this alloimmune syndrome caused by vaccine-induced alloreactive antibodies? *Vaccine.* 29:5267.
- Barkema HW, Bartels CJ, van Wuijckhuise L, Hesselink JW, Holzhauser M, Weber MF, Franken P, Kock PA, Brusckke CJ, Zimmer GM.** 2001. Outbreak of bovine virus diarrhoea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhoea virus type 2. *Tijdschr Diergeneeskde.* 126 (6):158-65.
- Bauhofer O, Summerfield A, Sakoda Y, Tratschin JD, Hofmann M A, Ruggli N.** 2007. Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *Journal of Virology.* 81(7), 3087-3096.
- Becher P, Orlich M, Kosmidou A, König M, Baroth M, Thiel HJ.** 1999. Genetic diversity of Pestiviruses: identification of novel groups and implication for classification. *Virology*, 262, 64-71.
- Becher P, Orlich M, Shannon AD, Horner G, König M, Thiel HJ.** 1997. Phylogenetic analysis of Pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol.* 78:1357-1366.
- Becher P, Orlich M, Thiel, H. J.** 2001. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: Generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *Journal of Virology.* 75(14), 6256-6264.
- Becker Y.** 2000. Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: an introduction. *Virus Genes*, 21(1-2):7-12.
- Beer M, Hennen HR, Wolfmeyer A, Poll G, Kaaden OR, Wolf G.** 2000. A new inactivated BVDV genotype I and II vaccine. An immunisation and challenge study with BVDV genotype I. *Vet Microbiol.* 77(1-2):195-208. doi: 10.1016/s0378-1135(00)00276-5. PMID: 11042413.

- Behera SP, Mishra N, Nema RK, Pandey PD, Kalaiyarasu S, Rajukumar K, Prakash A.** 2015. Expression of bovine viral diarrhoea virus envelope glycoprotein E2 in yeast *Pichia pastoris* and its application to an ELISA for detection of BVDV neutralizing antibodies in cattle. *J. Immunoassay Immunochem.* 26 (6): 639-54.
- Bennett RM, Christiansen K, Clifton-Hadley RS.** 1999. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. *Journal of Dairy Research*, 66:455–9.
- Biuk-Rudan N, Cvetnić S, Madić J, Rudan D.** 1999. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology*. Apr 1;51(5):875-81.
- Bolin SR.** Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. 1995. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11(3):615-25. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30470-9. PMID: 8581866.
- Bolin SR, Ridpath JF.** 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am J Vet Res.* 53: 2157-2163.
- Bolin SR, Ridpath JF, Black J, Macy M, Roblin R.** 1994. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods.* 48: 211.
- Bolin SR, Ridpath JF.** 1995. Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am J Vet Res.* 56 (6): 755-759.
- Bolin SR, Ridpath JF.** 1998. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J Vet Diagn Invest*, 10 (2): 135–9.
- Booth RE, Thomas CJ, El-Attar LMR, Gunn G, Brownlie J.** 2013. A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data. *Vet. Res.* 44, 43.
- Brodersen BW, Kelling CL.** 1999. Alteration of Leukocyte Populations in Calves Concurrently Infected with Bovine Respiratory Syncytial Virus and Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Viral Immunology.* 12(4): 323-334.
- Brownlie J.** 2005. Bovine virus diarrhoea virus -strategic directions for diagnosis and control, *BVDV Symposium 2005*. VetLearn, Massey University, Palmerston North, Wellington, New Zealand, pp.1-19.
- Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ, Pocock DH.** 1987. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann Rech Vet*, 18, 157-66.
- Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ.** 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec.* 114:535–536.
- Brownlie J, Thompson I, Curwen A.** 2000. Bovine virus Diarrhoea virus-strategic decisions for diagnosis and control. *In Practice*, 176-187.
- Bruschke CJ, Moormann RJ, van Oirschot JT, van Rijn PA.** 1997. A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine*, 15(17-18):1940-5.
- Bruschke CJ, Weerdmeester K, van Oirschot JT, van Rijn PA.** 1998a. Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet Microbiol.* 64:23–32.

- Bruschke CJ, Haghparast A, Hoek A, Rutten VP, Wentink GH, van Rijn PA, van Oirschot JT.** 1998b. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol* 62:37–50.
- Carman S, van Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi E, Tremblay R, Bolin S, Godkin A, Anderson N.** 1998. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993–1995. *J Vet Diagn Invest.* 10(1):27–35.
- Chase CC, Elmowalid G, Yousif AA.** 2004. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20:95–114. doi: 10.1016/j.cvfa.2003.11.004
- Childs T.** 1946. "X disease in cattle - Saskatchewan." *Can J Comp Med.* 10:316-319.
- Chimeno Zoth S, Leunda M.R., Odeón A, Taboga O.** 2007. Recombinant E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus induces a solidhumoral neutralizing immune response but fails to confer total protection in cattle. *Braz J Med Biol Res,* 40, 813-818.
- Collett MS, Larson R, Belzer SK, Retzel E.** 1988. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a Pestivirus. *Virology* 165.1: 200-208.
- Cordova-Izquierdo A, Córdova-Jiménez CA, Córdova-Jiménez MS, Saltijeral-Oaxaca JA, Ruiz-Lang CG, Xolalpa-Campos VM, Cortés-Suárez S, Guerra-Liera JE.** 2007. Seroprevalence of cattle abortive diseases from Mexican humid tropic. *Rev. vet.* 18: 2, 139–142.
- Cortez A, Heinemann MB, De Castro AMMG, Soares RM, Pinto AMV, et al.,** 2006. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 59-UTR region. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 26: 211–216.
- Correa GP, Brown LN, Bryner JH.** 1974. Presencia de anticuerpos contra rinotraqueitis infecciosa, diarrea viral bovina, parainfluenza 3, brucelosis, leptospirosis, vibriosis y Haemophilus somnus en sueros de bovinos con problemas patologicos reproductores y respiratorios. *Tee. Pee. Alex.* 29, 26-33.
- Darbyshire JH.** 1962. Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle. II. A serological relationship between mucosal disease and swine fever. *Res Vet Sci.* 3:125–128.
- David GP, Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR.** 1994. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet Rec,*134:468–472.
- Decaro N, Lucente MS, Mari V, Cirone F, Cordioli P, Camero M, Sciarretta R, Losurdo M, Lorusso E, Buonavoglia C.** 2011. Atypical Pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg Infect Dis.* 17: 1549–1552.
- Deregt D, Bolin SR, van den Hurk J, Ridpath JF, Gilbert SA.** 1998. Mapping of a type 1- specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhea virus with neutralization escape mutants. *Virus Res;* 53:81e90.
- Deng M, Ji S, Fei W, Raza S, He C, Chen Y, Chen H, Guo A.** 2015. Prevalence Study and Genetic Typing of Bovine Viral Diarrhea Virus BVDV in Four Bovine Species in China. *PLoS ONE.* 104, e0121718.
- Deutskens F, Lamp B, Riedel CM, Wentz E, Lotchnit G, Doll K, Thiel HJ, Rumenapf T.** 2011. Vaccine-induced antibodies linked to bovine neonatal pancytopenia (BNP) recognize cattle major histocompatibility complex class I (MHC I). *Vet Res* 42, 97 (2011). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-97>.
- Donis RO, Corapi W, Dubovi EJ.** 1988. Neutralizing Monoclonal Antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus Bind to the 56K to 58K Glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 69: 77-86.

- Donofrio G, Bottarelli E, Sandro C, Flammini CF.** 2006. Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 as a soluble secreted form in a Mammalian cell line. *Clin Vaccine Immunol.* 13(6):698-701. doi:10.1128/CVI.00071-06.
- Donofrio G, Sartori C, Franceschi V, Capocefalo A, Cavirani S, Taddei S, Flammini CF.** 2008. Double immunisation strategy with a BoHV-4-vectorialized secreted chimeric peptide BVDV-E2/ BoHV-1-gD. *Vaccine* 26:6031–6042.
- Dubovi EJ.** 1992. Genetic diversity and BVD virus. *Comp. Immun. Microbiol Infec Dis.* 15:155–62.
- Elbers K, Tautz N, Becher P, Stoll D, Rumenapf T, Thiel HJ.** 1996. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J Virol* 70, 4131-4135.
- Falcone E, Tollis M, Conti G.** 1999. Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine.* 14:18 (5-6):387-8.
- Falcone E, Cordioli P, Tarantino M, Muscillo M, Sala G, La Rosa G, Archetti IL, Marianelli C, Lombardi G, Tollis M.** 2003. Experimental infection of calves with Bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV2) isolated from a contaminated vaccine. *Veterinary Research Communications*, 27: 577-589.
- Fetzer C, Tews BA, Meyers G.** 2005. The carboxy-terminal sequence of the Pestivirus glycoprotein Erns represents an unusual type of membrane anchor. *J Virol.* 79, 11901–11913.
- Flores EF, Ridpath JF, Vogel FS, Gil LH.** 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 87(1):51–60.
- Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE, Burge LJ.** 2000. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res.* 64(3): 151–159.
- Fulton RW, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME.** 2003. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals.* 31(2):89-95. doi: 10.1016/s1045-1056(03)00021-6. PMID: 12770537.
- Fulton RW, Step DL, Ridpath JF, Saliki JT, Confer AW, Johnson BJ, Briggs RE, Hawley RV, Burge LJ, Payton ME.** 2003. Response of calves persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subtype 1b after vaccination with heterologous BVDV strains in modified live virus vaccines and Mannheimia haemolytica bacterin-toxoid. *Vaccine*, 21(21–22):2980–5.
- Gao S, Luo J, Du J, Lang Y, Cong G, Shao J, Lin T, Zhao F, Belák S, Liu L, Chang H, Yin H.** 2012. Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus in Western China. *Vet Microbiol.* 2013 Apr 12;163 (1-2):172-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.015.
- Giammarioli M, Ridpath JF, Rossi E, Bazzucchi M, Casciari C, De Mia GM.** 2015. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals.* 2015 Jul;43(4):220-4. doi: 10.1016/j.
- Gómez-Romero N, Basurto-Alcántara FJ, Verdugo-Rodríguez A, Bauermann FV, Ridpath JF.** 2017. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus in cattle from Mexico. *J Vet Diagn Invest.* 29(3):362-365. doi: 10.1177/1040638717690187.

Gomez-Romero N, Ridpath JF, Basurto-Alcantara FJ, Verdugo-Rodriguez A (a). Bovine Viral Diarrhea Virus in Cattle From Mexico: Current Status. *Front Vet Sci.* 2021 Aug 13; 8:673577. doi: 10.3389/fvets.2021.673577. PMID: 34485426; PMCID: PMC8414649.

Gómez-Romero N, Velazquez-Salinas L, Ridpath JF, Verdugo-Rodríguez A, Basurto-Alcántara FJ (b). Detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus found contaminating commercial veterinary vaccines, cell lines, and fetal bovine serum lots originating in Mexico. *Arch Virol.* 2021 Jul;166(7):1999-2003. doi: 10.1007/s00705-021-05089-9. Epub 2021 May 10. PMID: 33970345; PMCID: PMC8107421.

Grummer B, Beer M, Liebler-Tenorio E, Greiser-Wilke I. 2001. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 82: 2597- 2605.

Gunn HM. 1993. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 132, 584±585.

Haider N, Rahman MS, Khan SU, Mikolon A, Gurley ES, Osmani MG, Shanta IS, Paul SK, Macfarlane-Berry L, Islam A, Desmond J, Epstein JH, Daszak P, Azim T, Luby SP, Zeidner N, Rahman MZ. 2014. Identification and epidemiology of a rare HoBi-like Pestivirus strain in Bangladesh. *Transbound Emerg Dis.* 61(3):193-8.

Haines DM, Martin KM, Clark EG, Jim GK, Janzen ED. 2001. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Can Vet J.* 42(11): 857–860.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Harada T, Tautz N, Thiel HJ. 2000. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol.* 74.20: 9498-9506.

Heffes CS, Mullis FG. 1995. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Washington D.C., EUA.

Heimann M, Roman-Sosa G, Martoglio B, Thiel HJ, Rümenapf T. 2006. Core protein of Pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *J. Virol.* 80: 1915-1921.

Houe H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North America: Food Animal Practice,* 11: 521-547.

Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology,* 64, 89-107.

Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals.* 2003,31(2):137–143.

Houe H, Lindberg A, Moennig V. 2006. Test strategies in Bovine Viral Diarrhoea Virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest.* 18: 427-36.

Heuer C, Healy A, Zernini C. 2007. Economic Effects of Exposure to Bovine Viral Diarrhoea Virus on Dairy Herds in New Zealand. *J. Dairy Sci.* 90:5428–5438

Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, McCauley JW. 2004. Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol.* 78(1):136–45.

Jackova A, Novackova M, Pelletier C, Audeval C, Gueneau E, Haffar A, Petit E, Rehby L, Vilcek S. 2008. The extended genetic diversity of BVDV-1: typing of BVDV isolates from France. *Vet. Res. Commun.* 32 (1), 7–11.

- Jenckel M, Höper D, Schirrmeier H, Reimann I, Goller KV, Hoffmann B, Beer M.** 2014. Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus detected by deep sequencing. *J Virol.* 88(12):6983-92. doi: 10.1128/JVI.00620-14.
- Kadir Y, Christine F, Barbara BW, Zeki Y, Feray A, Aykut O, Ibrahim B, Sibilina Cedillo R, Heinz-Jürgen T, Matthias K.** 2008. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet. Microbiol.* 130 (3–4), 258–267.
- Kalaiyarasu, S, Mishra, N, Jayalakshmi, K, Selvaraj P, Sudhakar SB, Jhade SK, Sood R, Premalatha N, Singh VP.** 2021. Molecular characterization of recent Hobi-like pestivirus isolates from cattle showing mucosal disease-like signs in India reveals emergence of a novel genetic lineage. *Transbound Emerg Dis.* 00: 1– 19. <https://doi.org/10.1111/tbed.13981>
- Kirkland P, McGowan M, Mackintosh S.** 1993. Factors influencing the development of persistent infection in cattle with Pestivirus. En: Proceedings of the second symposium on Pestiviruses. P. 117-21.
- Kohl W, Grone A, Moennig V, Herrler G.** (2007) Expression of the surface glycoprotein E2 of Bovine viral diarrhoea virus by recombinant vesicular stomatitis virus. *J Gen Virol* 88:157–165.
- Kolasar AS, Tongaonkar PC.** 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett;* 276:172-174.
- Lambot M, Douart A, Joris E, Letesson J, Pastoret P.** 1997. Characterization of immune response of cattle against noncytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol.* 78: 1041-1047.
- Lang-Ree JR, Vatn T, Kommisrud E, Lùken T.** 1994. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet. Rec.* 135, 412±413.
- Largo E, Gladue DP, Huarte N, Borca MV, Nieva JL.** 2014. Pore-forming activity of pestivirus p7 in a minimal model system supports genus-specific viroporin function. *Antiviral Research,* 101, 30–36.
- Larsen JE, Lund O, Nielsen M.** 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res;* 2: 2.
- Laureyns J, Ribbens S, de Kruif A.** 2010. Control of bovine viral diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives on the detection of persistently infected cattle. *The Veterinary Journal,* 184;21-26.
- Lawrence J, McClure C.** IDEXX HerdChek BVD Antigen Test Kit: Summary of Results from Large-Scale BVDV Laboratory Testing. Proceedings from: 50th Annual Conference of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians; October 2007; Reno, Nev, USA.
- Liang D, Fernández-Sainz I, Ansari IH, Gil LHV, Vassilev V, Donis RO.** 2003. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant Pestivirus. *J. Gen. Virol.* 84: 1269-1274.
- Lecot S, Belouzard S, Dubuisson J, Rouille Y.** 2005. Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 79: 10826–10829.
- Leifer I, Ruggli N, Blome S.** 2013. Approaches to define the viral genetic basis of classical swine fever virus virulence. *Virology.* 438(2), 51–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.01.013>.
- Lértora WJ.** 2003. Diarrea viral bovina: actualización. *Rev. Vet.* 14:1.

- Liang D, Chen L, Ansari IH, Gil LH, Topliff CL, Kelling, CL.** 2009. A replicon trans-packaging system reveals the requirement of nonstructural proteins for the assembly of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) virion. *Virology*. 387(2), 331–340.
- Liang D, Sainz IF, Ansari IH, Gil LH, Vassilev V, Donis RO.** 2003. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J Gen Virol* 84:1269e74.
- Liebler-Tenorio E.M.** Pathogenesis en: Goyal SM, Ridpath JF, editors. 2005. Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control. Ames, IA: Blackwell Publishing. p. 121-144.
- Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD.** 2003, Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J Vet Diagn Invest* 15:221–232.
- Lindberg A, Alenius S.** 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infectious in cattle populations. *Vet Microbiol*. 64: 97-222.
- Lindberg A, Houe H.** 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Preventive Veterinary Medicine*, 72; 55–73.
- Lindberg A, Browlie J, Gunn G, Houe H, Moennig V.** 2006. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev sci tech off int Epiz*. 25:961-979.
- Liu L, Lehmkuhl HD, Kaeberle ML.** 1999. Synergistic effects of bovine respiratory syncytial virus and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection on selected bovine alveolar macrophage functions. *Can J Vet Res*. 63(1): 41–48.
- Liu L, Xia H, Baule C, Belák S.** 2009a. Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel Pestivirus, SVA/cont-08. *Arch Virol*. 154: 1111–1116.
- Liu L, Kampa J, Belák S, Baule C.** 2009b. Virus recovery and full-length sequence analysis of the atypical bovine Pestivirus Th/04_KhonKaen. *Vet Microbiol*. 138: 62–68.
- Loken T, Krogsrud J, Larsen IL.** 1991. Pestivirus infections in Norway. Serological investigations in cattle, sheep and pigs. *Acta Vet Scand*. 32:27–34.
- López-Pérez TJ.** 2014. Genotipificación de virus de la diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros. [Tesis de maestría]. Ciudad de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- Loy JD, Gander J, Mogler M, Vander Veen R, Ridpath J, Harris DH, Kamrud K.** 2013. Development and evaluation of areplicon particle vaccine expressing the E2 glycoprotein of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle. *Virology Journal*. 10:33.
- Ma R, Zhao J, Du HC, Tian S, Li LW.** 2012. Removing endotoxin from plasmid samples by Triton X-114 isothermal extraction. *Anal Biochem*. 15;424(2):124-6.
- Mahy BWh, Van Regenmortel MHV.** 2010. Desk encyclopedia of animal and bacterial viruses. *Elsevier*.
- Mahony TJ, McCarthy FM, Gravel JL, Corney B, Young PL, Vilcek S.** 2005. Genetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses from Australia. *Vet Microbiol*. 2005 Mar 20;106(1-2):1-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.10.024. Epub 2005 Jan 26. PMID: 15737468.
- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.** 2008. 6th edition. Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf

- Martin SW, Bateman KG, Shewen PE, Rosendal S, Bohac JG, Thorburn M.** 1990. A group level analysis of the associations between antibodies to seven putative pathogens and respiratory disease and weight gain in Ontario feedlot calves. *Can J Vet Res.* 54(3): 337–342.
- Maurer K, Krey T, Moennig V, Thiel HJ, Rumenapf T.** 2004. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* 78: 1792–1799.
- Mätzener P, Magkouras I, Rumenapf T, Peterhans E, Schweizer M.** 2009. The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and doublestranded RNAs. *Virus Research*, 140(1–2), 15–23.
- Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G.** 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 20(3):489-510. doi:10.1128/CMR.00005-07
- Meyers G, Thiel HJ.** 1996. Molecular characterization of Pestiviruses. *Adv Virus Res* 47: 53–118.
- Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi EJ, Collett MS,** et al. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic Pestiviruses. *Virology*, 191: 368-386.
- Mishra N, Rajukumar K, Pateriya A, Kumar M, Dubey P, Behera SP, Verma A, Bhardwaj P, Kulkarni DD, Vijaykrishna D, Reddy ND.** 2014. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like Pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet Microbiol.* 174(1-2):239-46.
- Moennig V, Liess B.** 1995. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11, 477–487.
- Monteiro Francielle L, Cargnelutti Juliana F, Braunig Patrícia, Folgueras-Flatschart Aurea V., Santos Nathália C, Pituco Edvigés M, Weiblen Rudi, Flores, Eduardo F.** Detection and genetic identification of pestiviruses in Brazilian lots of fetal bovine serum collected from 2006 to 2014. 2018. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(3), 387-392. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5283>.
- Mooi E, Sarsted M.** Cluster analysis. In: Springer –Verlag Berlin Heidelberg editions. A concise guide to market research; 2011.pp. 237–283.
- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ.** 1999. *Veterinary Virology*. Third edition. Academic Press. 555-569. 629 págs.
- Nagai M, Hayashi M, Itou M, Fukutomi T, Akashi H, Kida H, Sakoda Y.** 2008. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes* 36 (1), 135–139.
- Neill JD.** 2013. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*.41(1):2-7. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.07.002. Epub 2012 Aug 11. PMID: 22884672.
- Nettleton PF, Entrican G.** 1995. Ruminant Pestiviruses. *Br. Vet. J.* 151: 615–642.
- Nobiron I, Thompson I, Browlie J, Collins M.** 2003. DNA vaccination against Bovine Viral Diarrhea Virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine*, 21: 2082-92.
- Olafson P, MacCallum AD, Fox A.** 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36: 205-213.
- Pastoret PP.** 2010. Human and animal vaccine contaminations. *Biologicals*, 38: 332-334.

- Pastoret P-P, Blancou J, Vannier P, Verschuereen C**, editors. 1997. *Veterinary vaccinology*. Elsevier.
- Palomares RA, Marley SM, Givens MD, Gallardo RA, Brock KV**. 2013. Bovine viral diarrhoea virus fetal persistent infection after immunization with a contaminated modified-live virus vaccine. *Theriogenology* 79:1184–95. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.017
- Pecora A, Malacari DA, Pérez Aguirreburualde MS, Bellido D, Escribano JM, Dus Santos MJ, Wigdorovitz A**. 2015. Development of an enhanced bovine viral diarrhoea virus subunit vaccine based on E2 glycoprotein fused to a single chain antibody which targets to antigen-presenting cells. *Rev Argent Microbiol*. 47(1):4-8. doi: 10.1016/j.ram.2014.12.004. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25697468.
- Peletto S, Zuccon F, Pitti M, Gobbi E, Marco LD, Caramelli M, Masoero L, Acutis PL**. 2012. Detection and phylogenetic analysis of an atypical Pestivirus, strain IZSPLV_To. *Research in Veterinary Science*, 92 (1) 147–150.
- Pellerin C, Van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P**. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203:260–268.
- Pestova TV, Hellen CU**. 1999. Internal initiation of translation of bovine viral diarrhoea virus RNA. *Virology*, 258:249–256.
- Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M**. 2010. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging Pestivirus doomed to extinction. *Vet Res*. 41:44.
- Plant JW, Littlejohns IE, Gardiner AC**, et al. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *Vet Rec* 1973;92(17):455.
- Poole TL, Wang C, Popp RA, Potgieter LN, Siddiqui A, Collett MS**. 1995. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206, 750-754.
- Postel A, Smith DB, Becher P**. 2020. Proposed update to the Taxonomy of Pestivirus: Eight additional species within the genus *Pestivirus*, Family *Flaviviridae*. *Viruses*. 13(8):1542. <https://doi.org/10.3390/v13081542>
- Potgieter LN, McCracken MD, Hopkins FM, Walker RD**. 1984. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am J Vet Res*. 45(4):687-90.
- Pronobis MI, Deutch N, Peifer M**. 2016. The Miraprep: A protocol that uses a miniprep kit and provides maxiprep yields. *PLOS ONE*. 11(8).
- Radostits OM, Littlejohns IR**. 1988. New concepts in the Pathogenesis, Diagnosis and Control of Diseases Caused by the Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Can. Vet. J.* 29: 513-528.
- Ramírez G, Vera V, Villamil L**. 1999. Diarrea viral bovina-DVB inmunosupresión y efectos en la reproducción bovina. *El Cebú*, 32-40.
- Reber AJ, Tanner M, Okinaga T, Woolums AR, Williams S, Ensley DT, Hurley DJ**. 2006. Evaluation of multiple immune parameters after vaccination with modified live or killed bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2006 Jan;29(1):61-77. doi: 10.1016/j.cimid.2006.01.001. PMID: 16543046.
- Reyes-Montellano AG, Lezama-Ramírez J, Basurto-Alcántara FJ, Rodríguez-Morales O**. 2020. Tesis “Desarrollo de un modelo murino de infección con el virus de la diarrea viral bovina”. Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. FMVZ-UNAM.

- Rice P, Longden I, Bleasby A.** 2000. *EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. Trends Gen; 16: 276-277.*
- Ridpath JF.** 2010. Bovine viral diarrhoea virus: Global status. *Vet Clin Food Anim* 26 105–121.
- Ridpath JF.** Immunology of BVDV vaccines. 2013. *Biologicals* 41:14–9. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.07.003
- Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ.** 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 205: 66-74.
- Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG.** 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol*, 77(1–2):145–55.
- Ridpath JF, Neill JD, Vilcek S, Dubovi E, Carman S.** 2006. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet. Microb.* 114: 196-204.
- Ridpath JF, Lewis TL, Bolin SR, Berry ES.** 1991. Antigenic and genomic comparison between non-cytopathic and cytopathic bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle that had spontaneous mucosal disease. *J. Gen. Virol.* 72: 725-729.
- Reichel MP, Hill FI, Voges H.** 2008. Does control of bovine viral diarrhoea infection make economic sense? *New Zealand Veterinary Journal*, 56:2, 60-66.
- Rodning SP, Marley MS, Zhang Y, Eason AB, Nunley CL, Walz PH, Riddell KP, Galik PK, Brodersen BW, Givens MD.** 2010. Comparison of three commercial vaccines for preventing persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology*.73(8):1154-63. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.01.017. Epub 2010 Feb 23. PMID: 20181385.
- Rondón I.** 2006. Diarrea Viral Bovina: Patogénesis e inmunopatología. *Rev. MVZ Córdoba*, 11 (1):694-704.
- Rosas CT, König P, Beer M, Dubovi EJ, Tischer BK, Osterrieder N.** 2007. Evaluation of the vaccine potential of an equine herpesvirus type 1 vector expressing bovine viral diarrhoea virus structural proteins. *J Gen Virol* 88:748–757.
- Rümenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ.** 1993. Processing of the envelope glycoproteins of Pestiviruses. *J Virol.* 67.6: 3288-3294.
- Saha S, Raghava GPS.** 2004. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. En G. Nicosia, V. Cutello, P.J. Bentley y J.Timis (Eds.) ICARIS. LNCS 3239, 197-204.
- Sagar M, Goyal, Ridpath JF.** 2008. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management, and Control.* Ames, IA: Blackwell Publishing. p. 121-144.
- Saldívar PVM, Posadas ME, Hernández-Ignacio J.** 2009. Monitoreo serológico de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y diarrea viral bovina (DVB) en ganado de doble propósito en el municipio de Miacatlan Estado de Morelos. *Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Buiatría.* 6 agosto, Chiapas, México.
- Sangewar N, Hassan W, Lokhandwala S, Bray J, Reith R, Markland M, Sang H, Yao J, Fritz B, Waghela SD, Abdelsalam KW, Chase CCL, Mwangi W.** Mosaic Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigens Elicit Cross-Protective Immunity in Calves. 2020. *Front Immunol.*11:589537. doi: 10.3389/fimmu.2020.589537. PMID: 33281819; PMCID: PMC7690067.

Schirrmeier H, Strebelow G, Depner K, et al., 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical Pestivirus isolate, a putative member of a novel Pestivirus species. *J Gen Virol.* 85(Pt 12):3647–52.

Seong G, Oem JK, Lee KH, Choi KS. 2015. Experimental infection of mice with bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol.* 160(6):1565-71. doi: 10.1007/s00705-015-2412-4. Epub 2015 Apr 9. PMID: 25850760.

Simmonds P, Becher B, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, Muerhoff S, Pletnev A, Rico-Hesse R, Smith DB, Stapleton JT, and ICTV Report Consortium. 2019. The 10th report of the *International committee on virus taxonomy*. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Flaviviridae*, *Journal of General Virology*, 98:2-3.

Silveira S, Weber MN, Mósena AC, da Silva MS, Streck A. F, Pescador CA, Flores EF, Weiblen R, Driemeier D, Ridpath JF y Canal CW. 2015. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transboundary and Emerging Diseases* doi: 10.1111/tbed.12427.

Sopp P, Hooper LB, Clarke MC, Howard CJ, Brownlie J. 1994. Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. *J Gen Virol.* 75:1189–1194.

Stalder HP, Meier P, Pfaffen G, Wageck-Canal C, Rüfenacht J, Schaller P, Bachofen C, Marti S, Vogt HR, Peterhans E. 2005. Genetic heterogeneity of Pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev Vet Med.* 72(1–2):37–41 [discussion: 215–9].

Suzan VM, Onuma M, Aguilar RE, Murakami Y. 1983. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *Jpn J Vet Res.* 31:125-132.

Stringfellow D, Riddell K, Givens M.D, Galik P, Sullivan E, Robl J, Kasinathan P. 2005. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cell lines used for somatic cell cloning. *Theriogenology.* 1;63(4):1004-13.

Tacken PJ, Figdor CG. 2011. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines. *Semin Immunol.* 23:12.

Tautz N, Elbers K, Stoll D, Meyers G, Thiel HJ. 1997. Serine protease of Pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol.* 71.7: 5415-5422.

Tautz N, Tews BA, Meyers G. BookSection The Molecular Biology of Pestiviruses. 2015. 47-160. 10.1016/bs.aivir.2015.03.002

Tews BA, Schürmann EM, Meyers G. 2009. Mutation of Cysteine 171 of Pestivirus Erns RNase Prevents Homodimer Formation and Leads to Attenuation of Classical Swine Fever Virus. *Journal of Virology*, p. 4823–4834.

Thomas C, Young NJ, Heaney J, Collins ME, Brownlie J. 2009. Evaluation of efficacy of mammalian and baculovirus expressed E2 subunit vaccine candidates to bovine viral diarrhoea virus. *Vaccine* 27:2387–2393.

Thiel HJ, Plagemann PGW, Moennig V. 1996. Pestiviruses. En: Fields, B.N. (Ed.), *Virology*, 3rd Edition. Raven, Philadelphia, PA, pp. 1059±1074.

Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rumenapf T, Meyers G. 1991. Hog cholera virus: Molecular composition of virions from a pestivirus. *Journal of Virology*, 65,4705–4712.

Thierauf P. 1993. Untersuchungen zur Epidemiologie, Diagnose und Immunprophylaxe von BVD/MD-

Virusinfektionen in Milchviehzuchtbetrieben. [TESIS]. München [GER]. LMU.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res.* 22:4673-4680.

Underdahl NR, Grace OD, Hoerlein AB. 1957. Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. *Proc Soc Biol Med* 94: 795.

Vera V. 1999. Genética molecular del virus de la diarrea viral bovina. Memorias: Aspectos básicos de la fisiología reproductiva y perspectivas de la biotecnología en Colombia. Oct, 21. Villavicencio, Meta.

Vilcek, S, Paton DJ, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmannith, W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146, 99–115.

Xia H, Vijayaraghavan B, Belák S, Liu L. 2011. Detection and Identification of the Atypical Bovine Pestiviruses in Commercial Foetal Bovine Serum Batches, *PLoS ONE* 6(12).

Xue W, Minocha HC. 1993. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* 74: 73-79.

Xue F, Zhu YM, Li J, Zhu LC, Ren XG, Feng JK, Shi HF, Gao YR. 2010. Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China Between 2005 and 2008. *Veterinary Microbiology*, 143; 379-383.

Yardeni T, Eckhaus M, Morris H, Huizing M, Hoogstraten-Miller S. 2015. Lab Anim (NY) 2011 Yardeni.

Yesilbag K, Forster C, Ozyigit, MO, Alpay G, Tuncer P, Thiel HJ, König M. 2014. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet Microbiol* 169, 42-49.

Yim O, Ack Baraly K. 2015. Hierarchical Cluster Analysis: Comparison of Three Linkage Measures and Application to Psychological Data. *The Quantitative Methods for Psychology.* 11. 8-21. 10.20982/tqmp.11.1.p008.

Zabal O, Kobrak AL, Lager IA, Schudel AA, Weber EL. 2000. Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhoea virus. *Rev Argent Microbiol.* 32(1):27-32.

11. Anexos

11.1 Anexo 1. Grupos experimentales e identificación de animales

Este anexo describe los grupos experimentales utilizados en este estudio, así como la identificación de los animales. En el cuadro se indican en negritas los animales centinela de cada grupo experimental. En la columna “No. de Identificación” los recuadros en color verde indican los animales sacrificados 7 días post desafío, y los recuadros en blanco los animales sacrificados 21 días post desafío.

Grupo	Descripción	No. de Identificación
1	Animales inmunizados con la proteína recombinante E2e	66
		2
		4
		5
		8
		1
		3
		6
2	Animales inmunizados con la proteína recombinante E2e + Adyuvante	16
		9
		11
		14
		47
		10
		12
3	Animales inmunizados con la proteína recombinante E2p	23
		19
		20
		21
		24
		17
		18
		22
4		32
		26

		27
		29
	Animales inmunizados con la proteína recombinante E2p + poliacrilamida	31
		25
		28
		30
5	Animales inmunizados con vacuna comercial	40
		33
		35
		36
		39
		34
		37
		38
6	Animales inmunizados con VDVB cepa NADL	48
		41
		43
		46
		44
		42
		45
7	Animales inmunizados con SSF + Adyuvante	56
		49
		52
		54
		55
		50
		51
		53
8	Animales inmunizados con SSF + poliacrilamida	63
		57
		61
		64
		60
		62
9	SSF	13
		15

