



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**LA GLIBENCLAMIDA COMO MOLÉCULA INHIBIDORA DE LA
REPLICACIÓN DEL VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA EN
MACRÓFAGOS DE BOVINO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA

ZOOTECNISTA

PRESENTA

MEZTLI MIROSLAVA CANTERA BRAVO

Asesores:

MVZ Alejandro Benítez Guzmán

BQD Omar Escobar Chavarría

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2023



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.

DEDICATORIA

A mis ancestras, cuyos nombres se han perdido en el tiempo pero su esencia permanece en el uso de las hierbas, las historias y la valentía.

A mi abuela Rebeca, muestra de uno de los amores más grandes que he podido contemplar, con una humildad extraordinaria y un temple de acero.

A mi abuela Maricela, por demostrarme que la verdadera felicidad sólo puede alcanzarse cuando una se es leal, cuando una acepta lo que es.

A mi mamá, Sandra, por apoyar mis disparates, acompañarme en cada paso y levantarme en cada tropiezo, el amor que nos une va más allá del bien y el mal, más allá de lo divino.

A mi hermana, Bere, por siempre brindar momentos de alegría incontenible, dulzura y complicidad. Gracias a ti, sobreviví a mis peores noches y disfruté mis mejores días.

A mi Arenita, por inspirarme a elegir esta carrera, ser mi confidente y mi modelo en muchas de las materias que curse. Te llevo en el corazón hoy y siempre.

A Bagheera, cuyos maullidos sirven de despertador y caricias para el alma. Gracias por llegar cuando más lo necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Omar Escobar Chavarría, por quedarse a pesar del reto que este proyecto representó para ambos. Las palabras no alcanzan para expresar toda la gratitud que te tengo, lo mucho que valoro tu amistad y todo lo que he crecido gracias a tus enseñanzas y consejos.

A Claudia Gallegos Rodarte, por ser una amiga, una hermana, mi gurú y mi asesora honoraria. Tus enseñanzas, tanto de la vida como de la ciencia, junto con nuestros momentos de diversión siempre han sido un faro en la oscuridad, sin ti esto estaría incompleto.

A mi asesor principal, Alejandro Benítez Guzmán, por generar mi inquietud por la ciencia, recibirme en este mundo y brindar los recursos para mi crecimiento personal y científico. Gracias por acompañarme al final del trayecto, por ser tolerante hasta la médula, por ese vínculo forjado con oro, por guiarme hacia la utopía.

A Omar Cortéz Hernández por brindar su apoyo teórico y práctico durante la realización de este proyecto. Gracias por siempre estar dispuesto a ayudar, por adoptarme como una más del clan y por salvarme las veces que lo he necesitado.

Al resto de los miembros de Inmunofisiología y Proteómica: Montsey, Héctor, Isa, Josué, Aldo e Itzel por acompañarme en las distintas etapas que tuve en mi formación. Gracias a ustedes el laboratorio se convirtió en un refugio, un lugar de aprendizaje y de mucha, muchísima diversión.

A mi papá y abuelo, “Los Fernandos”, por brindarme su experiencia, consejos y consuelo. Gracias a ustedes tengo bien presente que la vida que vale es aquella que se disfruta en todo su esplendor.

A Jesús, por enseñarme que el amor se encuentra en los lugares más inesperados, que es algo que se planea y se ejecuta día con día, como un experimento, en el que desconoces

el resultado, pero siempre quieres llegar a él. Gracias por ser mi guía, mi consejero, mi confidente y mi compañero de aventuras, te llevo en el corazón.

La siguiente tesis fue financiada por el proyecto PAPIIT IN214121: Efecto de la activación del inflammasoma NLRP3 por la infección del VDVB en la inducción de muerte celular y la replicación viral. Asimismo, la alumna Cantera Bravo Meztli Miroslava recibió beca por parte de DGAPA PAPIIT IN214121.

CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1	Generalidades del virus de diarrea viral bovina	2
2.2	Patogenia.....	3
2.3	Cepa NADL.....	6
2.4	BVDV y el sistema inmune innato	7
2.5	Inflamación	9
2.6	Inflamasomas	10
2.10	Glibenclamida	13
2.11	Mecanismo de acción.....	14
2.12	Farmacocinética y farmacodinamia	14
2.13	Toxicidad en modelos animales.....	15
3.	JUSTIFICACIÓN.....	16
4.	HIPÓTESIS	16
5.	OBJETIVO GENERAL	16
5.1	Objetivos específicos	16
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1	Animales experimentales	17
6.2	Cultivo de macrófagos derivados de células mononucleares	17
	de sangre periférica.....	17
6.3	RT-PCR	18
6.4	Infección, expansión y titulación de la cepa NADL	19
6.5	Glibenclamida	20
6.6	Ensayo de citotoxicidad por medio de LDH.....	20
6.7	Ensayo de viabilidad celular por medio de MTT	20
6.10	Análisis estadístico.....	22
7.	RESULTADOS	22
7.1	Establecimiento del modelo de infección	22
7.2	Ensayos de citotoxicidad.....	24
7.3	Ensayos de viabilidad celular.....	25
7.5	El uso de glibenclamida y su efecto en el título viral	30
8.	DISCUSIÓN.....	32
9.	CONCLUSIONES.....	36

10. REFERENCIAS 37

1. RESUMEN

CANTERA BRAVO MEZTLI MIROSLAVA. La glibenclamida como molécula inhibidora del virus de diarrea viral bovina en macrófagos de bovino (bajo la dirección de: MVZ Alejandro Benítez Guzmán y BQD Omar Escobar Chavarría).

El virus de la diarrea viral bovina es un agente patógeno de distribución mundial que infecta al ganado bovino y a otros rumiantes de vida silvestre. Forma parte del complejo respiratorio y abortivo bovino, causando pérdidas económicas por afecciones respiratorias, digestivas y reproductivas. El virus es capaz de infectar a células del sistema inmune, entre ellas al macrófago, induciendo la secreción de interleucina 1- β dependiente del receptor NLRP3 y de caspasa 1. La inhibición de estos, causa una disminución en el título viral. Existen diversas moléculas, como la glibenclamida, que han sido utilizadas como inhibidores de la secreción de IL-1 β en modelos *in vitro* contra otros agentes, como el virus de fiebre porcina clásica. Debido al impacto económico de esta enfermedad y a la búsqueda de alternativas terapéuticas, el objetivo de este trabajo fue determinar si la glibenclamida inhibe la secreción de IL-1 β en macrófagos de bovino infectados con la cepa NADL, para asociar dicho efecto con el título viral. Se infectaron macrófagos de bovino a una multiplicidad de infección (MOI) 2:1 en presencia y ausencia de glibenclamida. Se recolectaron los sobrenadantes y se cuantificó la secreción de IL-1 β por medio de ELISA, calculando el título viral por el método de Reed and Muench. Nuestros resultados indican que la glibenclamida reduce la secreción de IL-1 β inducida por la cepa NADL de 4020 pg/ml a 788 pg/ml, pero no disminuye el título viral.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades del virus de diarrea viral bovina

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV por sus siglas en inglés) es un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae* y al género *Pestivirus* que se caracteriza por tener una sola cadena de ácido ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés) en sentido positivo, codificando a una sola poliproteína, y presentando una envoltura lipídica que se origina durante el ensamblaje y maduración de la proteína viral¹.

Su genoma tiene una longitud aproximada de 12.3 Kb y consiste en un sólo marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) flanqueado por 2 regiones no traducibles (UTR's por sus siglas en inglés) en 5'y 3'. El ORF codifica a una única poliproteína que es procesada postraduccionalmente en 4 proteínas estructurales, la proteína de la cápside, Erns, E1 y E2, además de 8 proteínas no estructurales conformadas por Npro, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B². La región no traducible 5', es utilizada para realizar la genotipificación de los *Pestivirus*, existiendo dos genotipos para BVDV; BVDV-1 y BVDV-2, sin embargo, recientemente se ha reconocido una nueva especie de *Pestivirus* denominado “HoBi-like” o “pestivirus atípico”, que ha sido considerado como la tercer especie para BVDV, denominado BVDV-3³. A su vez, estos genotipos se clasifican en 2 biotipos, llamados citopático⁴ y no citopático. El primero se caracteriza por inducir la formación de vacuolas y muerte en cultivo celular⁵, ,mientras que el segundo no genera daño en cultivo⁵ y es el responsable del 90 al 95% de aislamientos en campo junto con la mayoría de casos clínicos e infecciones persistentes⁶.

2.2 Patogenia

Las infecciones con BVDV pueden resultar en 3 tipos de infección; transitoria también llamada aguda, persistente, y del tracto reproductivo⁷. El BVDV puede transmitirse a través de una amplia variedad de fluidos corporales como las descargas nasales, orina, leche, semen, saliva, lágrimas, fluidos fetales y heces. La forma más común de infectarse es a través de aerosoles y contacto naso-nasal entre animales infectados y sanos. Una vez que el virus infecta la mucosa nasal, comienza su replicación en el tracto respiratorio y en los linfonodos, desde donde se propaga a través de células linfoides circulantes a la sangre⁸. Las infecciones agudas cursan con viremia transitoria 3 días post-infección y esta puede durar de 10 hasta 14 días⁹. Durante ese tiempo, el virus infecta células utilizando al receptor CD46 para su internalización¹⁰. CD46 está presente de manera ubicua en todas las células y es un cofactor para el factor I que escinde los factores del complemento C3b y C4b depositados en los tejidos del hospedador¹⁰. Debido a lo anterior, el BVDV es capaz de infectar a una gran variedad de células, incluyendo macrófagos y linfocitos, causando leucopenia a corto plazo, linfopenia, trombocitopenia, inmunosupresión, pirexia y diarrea⁹. Una vez en circulación sanguínea, el virus alcanza otros tejidos linfoides como el tejido linfoide asociado a intestino (GALT por sus siglas en inglés), el timo, tejido linfoide asociado a bronquios (BALT por sus siglas en inglés), bazo y otros linfonodos, entre ellos los mesentéricos para reincorporarse nuevamente al torrente sanguíneo y llegar al tracto digestivo. En el caso de las cepas de baja virulencia, su propagación culmina una vez que llegan a dicho sitio, sin embargo, las cepas de alta virulencia se distribuyen hacia médula ósea, tejidos endocrinos, tracto urogenital, corazón y piel, provocando la liberación de viriones desde heces, orina, saliva, y aerosoles^{8,11}. La mayoría de las cepas de BVDV son

[4]

de baja virulencia por lo que las infecciones agudas suelen pasar clínicamente desapercibidas o cursar con una infección leve¹².

Con respecto a las infecciones persistentes, estas ocurren cuando la madre gestante se infecta con una cepa no citopática de BVDV durante el primer trimestre de gestación. Debido a la inmadurez del sistema inmune del producto y a la falta de una respuesta eficiente por parte de este, el virus será reconocido como propio y permanecerá en la cría de manera persistente¹³, de ahí que estos animales reciban la denominación de persistentemente infectados (PI por sus siglas en inglés). Una vez que nacen, algunos animales PI presentan inmunosupresión, por lo que suelen morir antes del primer año de vida como consecuencia de infecciones recurrentes o al desarrollar enfermedad de las mucosas¹⁴. Aquellos que sobreviven, se convierten en reservorios y diseminan el virus dentro del hato a través de diferentes secreciones corporales como descargas nasales, saliva, semen y heces^{13,14}. Además de los animales PI, existe evidencia de que aquellos animales que se recuperan de una infección aguda pueden mantener una infección crónica en sitios inmunoprivilegiados, como ovarios, testículos y sistema nervioso central¹⁴.

Por otro lado, las infecciones en tracto reproductivo traen como consecuencia una disminución en la fertilidad del ganado y en la tasa de concepción y preñez, aumentando el intervalo entre partos y las repeticiones en servicio¹⁴. Al mismo tiempo, ocasiona un aumento en la incidencia de pérdidas embrionarias y fetales, junto con un aumento de mortalidad en becerros y retención placentaria¹⁴.

En vacas, la infección con BVDV provoca muerte celular necrótica tanto en ovocitos como en las células de la granulosa. La infección en éstas últimas, reduce la secreción de estradiol en el ovario y altera, al mismo tiempo, la secreción de la hormona luteinizante, trayendo como resultado alteraciones en la ovulación¹⁵. De la misma forma, las vacas infectadas

cursan con salpingitis, lo que puede interferir con la secreción y otras funciones fisiológicas del oviducto, comprometiendo el transporte del ovocito, espermatozoides y la fertilización¹⁶.

Otra de las alteraciones que produce BVDV, está relacionada con la interacción entre el ovocito y el espermatozoide durante la fertilización, ya que *in vitro* se ha reportado que la infección con una cepa citopática o no citopática disminuye la adhesión del espermatozoide al ovocito, disminuyendo la tasa de fertilización¹⁷.

En el caso de los embriones, la infección de la madre con una cepa citopática trae como consecuencia la muerte del producto¹⁸. Sin embargo, las cepas no citopáticas también son capaces de inducir la muerte del embrión y disminuir la presencia de progesterona en el suero de hembras gestantes¹⁹.

Continuando con el proceso de gestación, los fetos pueden llegar a infectarse a través de la placenta y el efecto de esto sobre el producto dependerá principalmente del tiempo de gestación en el que se infecte la madre, el tipo de cepa, biotipo y la virulencia de la misma²⁰. Tanto las cepas citopáticas como no citopáticas inducen abortos, y puede ocurrir en cualquier momento de la gestación, sin embargo, son predominantes en el primer tercio de la misma. Dependiendo del tiempo en el que ocurra el aborto puede generarse reabsorción, momificación o expulsión del producto²⁰.

Otro de los efectos que genera el BVDV sobre el feto son las malformaciones congénitas, las cuales ocurren cuando la madre se infecta entre el día 75 a 150 de gestación, durante la organogénesis. Las crías infectadas durante este período pueden presentar hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, hipoplasia tímica, hipoplasia pulmonar y retardo en el crecimiento²¹.

Al igual que en las hembras y sus crías, existen reportes de que el aparato reproductor de los machos también es susceptible a la infección con BVDV. Los sitios donde se ha aislado el agente corresponden a las glándulas seminales, la próstata y los testículos, generando una infección persistente y por lo tanto un medio de transmisión a través del semen²². Por otra parte también se han reportado anomalías en el semen y en la calidad del mismo, disminuyendo la concentración de espermatozoides junto con su motilidad²³. Todo esto en conjunto, visibiliza el impacto económico que la infección en tracto reproductivo, originada por BVDV, puede tener en las producciones de ganado bovino.

Por último, existe una forma fatal de la enfermedad denominada enfermedad de las mucosas, la cual se genera cuando un animal PI se infecta con una cepa citopática de BVDV²⁴. Se caracteriza por presentar lesiones ulcerativas y necróticas en el epitelio de todo el tracto gastrointestinal, especialmente en el tejido linfático asociado a intestino²⁵. Estas lesiones también se pueden presentar en cavidad oral e incluso en cavidad nasal²⁶. Los animales cursan con hemorragias y diarreas profusas, lo que finalmente causará la muerte de estos²⁶.

2.3 Cepa NADL

La cepa NADL fue aislada en el año 1962, de un animal con enfermedad fatal de las mucosas²⁷, en el Laboratorio Nacional de Enfermedades Animales (NADL por sus siglas en inglés) en Estados Unidos, y atenuada en cultivo celular, utilizando células de riñón de cerdo, para la generación de las primeras vacunas atenuadas contra el BVDV junto con la cepa Oregon C24V, en 1968. Fue una de las dos primeras cepas citopáticas en ser secuenciadas, donde se descubrió que el BVDV tiene un sólo marco de lectura abierto. A su vez pertenece al genotipo 1 (BVDV-1 por sus siglas en inglés), el cual posee una mayor diversidad genética, conformado por 21 subgenotipos (BVDV 1a-1u)²⁸. En México

[7]

se encuentran los genotipos BVDV-1a, al que pertenece NADL²⁹, 1b, 1c y BVDV-2a, siendo predominante el genotipo BVDV-1c³⁰.

2.4 BVDV y el sistema inmune innato

La principal vía de entrada para el BVDV es la vía intranasal. Las células epiteliales de la vía aérea funcionan como la primera barrera de defensa, funcionando como una barrera física, química e inmunológica contra la infección³¹. El BVDV es capaz de replicarse en el epitelio respiratorio después de la infección apical y basolateral de dichas células. El cómo ingresa al organismo desde el epitelio respiratorio sigue siendo incierto, sin embargo, se hipotetiza la participación de células del sistema inmune presentes en la vía respiratoria como acarreadoras y diseminadoras del virus³¹.

Como se ha mencionado, el virus es capaz de infectar a diferentes células, pero tiene predilección por aquellas que conforman al sistema inmune, tanto innato como adaptativo³². En cuanto a las células del sistema inmune innato, se sabe que la infección de neutrófilos *in vitro*, disminuye la expresión de CD18 y CD62L, receptores importantes para la adhesión a células endoteliales, inhibiendo la migración de neutrófilos al sitio de infección³³. Otras células blanco del virus, son las denominadas células presentadoras de antígeno (APC por sus siglas en inglés), conformadas por los monocitos, macrófagos y células dendríticas (DC por sus siglas en inglés). Tanto las cepas citopáticas como no citopáticas de BVDV son capaces de infectar a las APC, generando progenie viral²⁹. Sin embargo, existen diferencias particulares entre ellas, ya que las DC son resistentes a la infección con cepas no citopáticas del BVDV (Pe515ncp) y a la apoptosis inducida por cepas citopáticas (Pe515cp)³². A pesar de esto, las APC infectadas disminuyen la expresión de receptores Fc y C3, que participan en la actividad fagocítica¹⁵. Particularmente en

monocitos disminuye la expresión del complejo principal de histocompatibilidad de clase 2 (MHC II por sus siglas en inglés) interfiriendo con la presentación antigénica⁸.

Al ser un virus, posee estructuras conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). Estos PAMPs serán reconocidos por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés)³⁴.

La mayoría de los PRRs expresados en células de vertebrados se clasifican en 5 clases de familias diferentes. En estas familias se encuentran proteínas transmembranales como los receptores tipo Toll (TLRs por sus siglas en inglés) y los receptores de lectina tipo C (CLRs por sus siglas en inglés), así como proteínas citoplasmáticas denominadas receptores tipo gen inducible por ácido retinoico (RIG-I por sus siglas en inglés), receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD y NLR por sus siglas en inglés)³⁵ y receptores tipo ausente en melanoma-2 (AIM-2 y ALR por sus siglas en inglés)³⁶. Los PRRs se expresan en diferentes tipos celulares, siendo las células del sistema inmune las más representativas³⁴. La activación de los PRRs aumenta la transcripción de genes que codifican para la síntesis de citocinas, proteínas antimicrobianas e interferones tipo I (IFN-I por sus siglas en inglés)³⁴.

El interferón es la citocina antiviral más importante y muchos virus, incluido BVDV, son capaces de inducir la producción de IFN tipo I, principalmente IFN- α e IFN- β . Esto es dependiente del biotipo y genotipo de la cepa, sin embargo, se ha reportado que las cepas citopáticas de BVDV aumentan la síntesis de IFN tipo I, mientras que las no citopáticas inhiben la producción de dichas citocinas³⁷. El mecanismo por el cual las cepas no citopáticas evaden la respuesta inmune, está relacionado con la proteína no estructural N^{pro} que inhibe la inducción de IFN tipo I mediante la degradación, a través del proteosoma, del factor 3 de regulación de interferón (IRF-3 por sus siglas en inglés). Otra proteína viral

involucrada en el bloqueo de la producción de IFN es la proteína E^{RNS}, que tiene función de endonucleasa, degradando al RNA monocatenario en sustratos de doble cadena, previniendo la síntesis de IFN³⁸.

Se ha demostrado que la infección con el BVDV promueve una mayor expresión de genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias, en relación con la virulencia de la cepa³⁹. Al infectar becerros con una cepa de alta virulencia (BVDV-2 1373, ncp) se encontró, en los linfonodos traqueobronquiales, un aumento en la expresión de ARN mensajero (mRNA por sus siglas en inglés) que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α por sus siglas en inglés), interleucina 1- β (IL-1 β) e IFN- γ ³⁹.

En la línea celular de riñón de bovino de Madin-Darby (MDBK por sus siglas en inglés) se determinó un aumento en la expresión génica de IL-1 β , IL-15 e IL-18, dependiente de la vía del NF- κ B, al infectar las células con la cepa cp CH0001⁴⁰. En otro estudio realizado por Morales y colaboradores, se determinó por primera vez, que la cepa citopática NADL inducía la secreción de IL-1 β en macrófagos de bovino dependiente de caspasa 1⁴¹. Dichos resultados explicarían la inflamación que se presenta en distintos órganos durante la infección con el BVDV.

2.5 Inflamación

El término inflamación proviene de la palabra latina “inflammare” que significa arder⁴². Actualmente, se considera un mecanismo de defensa ante agentes infecciosos, daño celular, compuestos tóxicos, radiaciones y otros desafíos^{34,43}. Los PAMPs y los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés) inducen la activación de diversas células, principalmente neutrófilos, monocitos y macrófagos promoviendo la expresión de genes pro-inflamatorios⁴³. Esto traerá como consecuencia la liberación de citocinas, quimiocinas, y otros mediadores químicos que tendrán efecto a nivel celular y

vascular⁴². A nivel vascular, se promoverá la vasodilatación, aumentando la permeabilidad del vaso sanguíneo, favoreciendo la salida de plasma y proteínas⁴². En cuanto a los eventos celulares se favorecerá la expresión de receptores en endotelio y en las células del sistema inmune, permitiendo su migración al sitio de infección o daño⁴².

Entre las principales citocinas pro-inflamatorias encontramos al TNF- α , interleucina 6 (IL-6 por sus siglas en inglés) e IL-1 β ⁴³. Ésta última, es sintetizada como un precursor inactivo denominado pro-IL-1 β , el cual debe ser escindido a través del ensamblaje de complejos multiproteicos intracitoplasmáticos denominados inflamomas⁴⁴.

2.6 Inflamomas

El término inflamoma fue acuñado en el 2002, para describir el ensamblaje de estructuras supramoleculares en el citoplasma de células del sistema inmune previamente activadas con PAMP's o DAMP's. La activación de los inflamomas conlleva a la activación proteolítica de caspasas proinflamatorias con la subsecuente liberación de citocinas que participan en el proceso inflamatorio, en su forma madura y activa, como IL-1 β e IL-18⁴⁵. Dichos complejos se expresan en múltiples células, incluyendo macrófagos, DC, neutrófilos y células epiteliales⁴⁵.

Los inflamomas pueden participar en la vía canónica y no canónica de activación. Los inflamomas canónicos están conformados por una proteína sensor o PRR, una proteína adaptadora denominada proteína tipo mota asociada a apoptosis (ASC por sus siglas en inglés), que posee 2 dominios de pliegue de muerte: un dominio pyrin (PYD por sus siglas en inglés) y un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD por sus siglas en inglés) que le permitirá unir al sensor del inflamoma corriente arriba con la pro-caspasa⁴⁵. La vía no canónica del inflamoma es dependiente de caspasa 11 en el modelo ratón y de caspasa 4

y 5 en humanos⁴⁶. Se ha reportado su activación en presencia de LPS cuando éste alcanza el citoplasma⁴⁵.

Múltiples PRRs citoplasmáticos participan en la activación del inflamasoma, y se clasifican con base en las estructuras de sus dominios proteicos⁴⁵. Aquí se incluyen a aquellos que tienen un dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés), los que forman parte de la familia de proteínas que contienen repeticiones ricas en leucinas (NLR por sus siglas en inglés) como el NLRP1, NLRP3, NLRC4, así como las proteínas ausentes en melanoma 2 (AIM2, por sus siglas en inglés) y pyrin⁴⁵.

2.7 Inflamasoma NLRP3 e IL-1 β

El inflamasoma mejor estudiado hasta el momento es el inflamasoma NLRP3⁴⁷. Diversos estímulos inducen su activación, como los cristales de ácido úrico, sílice, asbesto, aluminio, ATP extracelular, toxinas formadoras de poros, flujo de iones y una diversidad considerable de virus, bacterias, hongos y protozoarios patógenos⁴⁵. El inflamasoma NLRP3 está conformado por el sensor NLRP3, ASC y pro-caspasa 1⁴⁸. Su activación en macrófagos requiere de 2 señales. La señal de inducción o primera señal puede ser generada por estímulos inflamatorios, como ligandos de TLR's, que activan al factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B por sus siglas en inglés) promoviendo la expresión génica del NLRP3 y pro-IL-1 β . La señal de activación o segunda señal es dada por PAMPs o DAMPs promoviendo el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 y la secreción de IL-1 β e IL-18 mediada por caspasa 1⁴⁸. Se ha determinado que en monocitos de humano la primera señal es suficiente para inducir la activación de caspasa 1 y la secreción de IL-1 β ⁴⁸.

La interleucina 1- β es una de las 11 citocinas que pertenecen a la familia de citocinas IL-1⁴⁹. Como se mencionó anteriormente, se sintetiza como un precursor denominado pro-IL-1 β . La activación de los inflasomas resulta en la forma madura de la citocina, sin

embargo, también puede ser escindida por otras proteínas. La proteinasa 3, en neutrófilos, al igual que la elastasa, la metaloproteasa de matriz 9 y granzima A pueden generar la forma activa de la citocina⁴⁹. Al ser una citocina proinflamatoria, fomenta la expresión de otros genes proinflamatorios como ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2 por sus siglas en inglés), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS por sus siglas en inglés) y quimiocinas. A su vez, promueve la expresión de integrinas en las células endoteliales promoviendo la infiltración celular en los tejidos y fomenta la diferenciación, proliferación y función de células NK, macrófagos y linfocitos⁵⁰.

2.8 IL-1 β en infecciones virales

Al ser una de las principales citocinas proinflamatorias, se ha descubierto que tiene una participación importante en la patogenia de algunos virus que pertenecen a la familia *Flaviviridae*. Estudios *In situ* con el virus del Zika (ZIK-V por sus siglas en inglés) demostraron que induce la secreción de IL-1 β , IL-18 e IL-33, agravando la neuroinflamación en casos fatales de microcefalia⁵¹. Por otro lado, el virus de hepatitis C (HCV por sus siglas en inglés), induce la producción de IL-1 β durante la infección de macrófagos hepáticos, manteniendo la respuesta inflamatoria y conllevando al desarrollo de fibrosis y cirrosis⁵². En el caso del virus de fiebre porcina clásica (CSFV por sus siglas en inglés), se determinó que inducía la secreción de IL-1 β dependiente del inflamasoma NLRP3. La inhibición de éste, aumentaba el título viral en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) de cerdo⁵³. En BVDV, la cepa citopática AV69 induce la translocación del NF- κ B y aumenta la expresión génica del NLRP3, ASC y pro-caspasa 1, así como, la secreción de IL-1 β ⁵⁴. La cepa NADL induce la secreción de IL-1 β dependiente de caspasa 1 y del NLRP3. La inhibición de estas moléculas trae como consecuencia la disminución del título viral durante la infección *in vitro*^{41, 55}.

2.9 Fármacos inhibidores de la secreción de IL-1 β

La IL-1 β tiene un papel fundamental en la inducción de daño y replicación durante las infecciones virales. A su vez, esta citocina tiene una participación importante en enfermedades crónicas como aterosclerosis, carcinoma hepatocelular por infección con HCV, enfermedad de Alzheimer, gota y diabetes mellitus tipo 2⁵⁶. Debido a esto y a que la secreción de IL-1 β está íntimamente relacionada con la activación de los inflamasomas, se han desarrollado inhibidores dirigidos contra diferentes blancos en la cascada de señalización. Algunos están dirigidos al PRR, como es el caso del fármaco inhibidor de la liberación de citocinas (CRID3 por sus siglas en inglés) que se une directamente al dominio NACHT de NLRP3⁵⁶. Otros inhibidores actúan sobre las caspasas pro-inflamatorias como es el caso del pralnacasan, que actúa inhibiendo a la caspasa 1⁵⁷. La oridonina inhibe la vía del NF- κ B y la consecuente secreción de citocinas pro-inflamatorias⁵⁶. Corriente arriba de la cascada de señalización se ha utilizado a la glibenclamida, que bloquea la salida de potasio y evita la activación del inflamasoma NLRP3⁵⁶.

2.10 Glibenclamida

Pertenece a las sulfonilureas de segunda generación. Las sulfonilureas son un grupo farmacológico que tuvo sus inicios durante la segunda guerra mundial, cuando se descubrió que la administración del fármaco antibacteriano sulfonamida 2254 RP causaba hipoglucemia⁵⁸. La tolbutamida fue la primera sulfonilurea segura y eficaz en venderse en Estados Unidos en el año de 1956. Sería hasta 1969, en Europa, cuando se introduciría la glibenclamida en el mercado⁵⁸. Al igual que las sulfonilureas de primera generación, la glibenclamida posee el núcleo de sulfonilurea, sin embargo, posee grupos estructurales más grandes y menos polares, lo que la hace más soluble en lípidos⁵⁸. Estas

modificaciones estructurales le confieren un efecto hipoglucémico mayor, siendo 200 veces más potente que la tolbutamida⁵⁸. Debido a esto, las dosis en humanos son relativamente bajas a comparación de las sulfonilureas de primera generación, utilizando de 2.5 a 5 mg hasta la dosis máxima de 40 mg por día⁵⁹.

2.11 Mecanismo de acción

La glibenclamida tiene como blanco terapéutico a los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP} por sus siglas en inglés). Estos canales son complejos octaméricos conformados por 4 por subunidades Kir6x (6.1 o 6.2) que forman el poro, y 4 subunidades de receptores para sulfonilurea (SUR por sus siglas en inglés)⁶⁰. Dos subtipos de SUR han sido identificados: SUR1 y SUR2. Las sulfonilureas se unen a las subunidades SUR1 a través de su grupo ciclohexilurea, inhibiendo el flujo de potasio a través de los canales K_{ATP} .

La forma en la que inhibe la secreción de IL-1 β aún es desconocida, sin embargo, se sabe que actúa corriente arriba del inflammasoma NLRP3 y corriente abajo del receptor P2X7. Respecto al efecto en otros inflamasomas, se sabe hasta el momento que no inhibe la secreción de IL-1 β dependiente del NLRP1 y NLRC4⁵⁶.

2.12 Farmacocinética y farmacodinamia

Un modelo abierto de 2 compartimentos describe la farmacocinética de este compuesto. La glibenclamida es bien absorbida después de la administración oral. Las formulaciones actuales presentan una absorción del 84 al 100%, sin ser alterada por la presencia de alimento⁶¹. El pico máximo del fármaco en plasma se alcanza entre las 2 y 6 horas en ayuno y se une en un 99% a la albúmina sérica. Se ha demostrado que se distribuye en órganos altamente perfundidos como hígado y riñones, con un volumen de distribución

de 9 a 10 litros. Se distribuye principalmente en el espacio extracelular, sin circulación enterohepática⁶².

El metabolismo del fármaco ocurre en hígado dando origen a 2 metabolitos: cis-3-hidroxicliburida y trans-4-hidroxicliburida, los cuales tienen efecto hipoglicémico⁶³. La vida media de eliminación es de 7 a 10 horas si la administración es por vía oral⁶¹. Su eliminación se da por vía renal y vía biliar en un porcentaje de 50 y 50⁶². En cuanto a la farmacodinamia, la glibenclamida promueve la secreción de insulina en las células β del páncreas a partir del bloqueo de canales de K_{ATP} . La inhibición del flujo de potasio promueve la despolarización de la membrana y la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs por sus siglas en inglés) estimulando la fusión de las vesículas de insulina a la membrana celular⁶⁴.

2.13 Toxicidad en modelos animales

En estudios de toxicidad en animales, se ha reportado que la dosis mínima que reduce los niveles de glucosa en ratones es de 0.2 mg/kg⁵⁸. La dosis letal media para esta especie (LD_{50} por sus siglas en inglés) es > 10 g/kg al igual que en ratas, conejos, cuyes y perros⁶⁵. En estudios a dosis repetidas se observaron cambios morfológicos en las células β del páncreas en ratas y conejos⁶⁵. Aunque la administración de glibenclamida durante la organogénesis no haya generado efectos teratogénicos en ratas, ratones y conejos, actualmente, está clasificada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) como un fármaco de categoría C, que estipula que los estudios de reproducción en animales han mostrado un efecto adverso en el feto y no existen estudios adecuados y bien controlados en humanos, pero los beneficios potenciales pueden justificar el uso del medicamento en mujeres embarazadas a pesar de los riesgos potenciales⁶⁶.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la secreción de IL-1 β junto con su inhibición en infecciones virales puede favorecer o interferir con la patogenia del agente viral, resulta crucial contribuir a la búsqueda y desarrollo de moléculas que puedan ser utilizadas como tratamiento no solo para las enfermedades animales relacionadas con este tipo de virus, sino también con otras enfermedades que tienen impacto en la salud humana como hepatitis C o Zika.

4. HIPÓTESIS

La glibenclamida disminuirá la secreción de IL-1 β en macrófagos de bovino previamente infectados con la cepa NADL del virus de diarrea viral bovina, reduciendo el título viral.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar el efecto que tiene la glibenclamida sobre la secreción de IL-1 β de macrófagos de bovino infectados con la cepa NADL del VDVB para asociarlo con el título viral.

5.1 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes concentraciones de glibenclamida en el modelo de macrófago de bovino, a través de ensayos de LDH y MTT, para evaluar la citotoxicidad del fármaco.
- Cuantificar por medio de ELISA, la secreción de IL-1 β inducida por la infección con la cepa NADL en presencia y ausencia de glibenclamida para asociarlo con el título viral.

- Realizar la titulación viral de la cepa NADL, a través del método de Reed y Müench en presencia de glibenclamida con el fin de determinar el efecto que tiene la inhibición de la secreción de IL-1 β en la replicación viral del BVDV

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales experimentales

Las vacas con las que se trabajó se encuentran en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El protocolo de manejo fue previamente aprobado por el CICUA con el número 0686.

El procedimiento que se llevó a cabo corresponde a la toma de muestra sanguínea, una vez cada dos semanas, obtenida de la vena yugular del bovino. Se extrajeron 180 ml de sangre, de los cuales 120 ml se obtuvieron con ACD (Ácido Citrato Dextrosa), como anticoagulante y los 60 ml restantes se destinaron a la obtención de suero autólogo.

6.2 Cultivo de macrófagos derivados de células mononucleares

de sangre periférica

En el laboratorio, se centrifugó la sangre en tubos de fondo cónico de 50 ml a 2,060Xg durante 30 minutos. Se colectó el plasma en un tubo de fondo cónico de 50 ml y en otro se colectó la capa leucoplaquetaria, evitando la obtención de glóbulos rojos.

Posteriormente se obtuvieron, a partir de un gradiente de densidad, los leucocitos con Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se centrifugó nuevamente a 2,060Xg durante 30 minutos, para obtener la separación de leucocitos y glóbulos rojos.

[18]

Tras la centrifugación se realizaron 3 lavados a los leucocitos obtenidos con PBS-citrato y plasma, entre cada lavado se centrifugó a 974Xg durante 10 minutos a una temperatura de 10°C. Al finalizar el aislamiento se procedió a sembrar los monocitos en placas de cultivo de ultra baja adherencia de 6 pozos, adicionando medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium, GIBCO) con 12% de suero autólogo. Los monocitos se incubaron durante 12 días a 37°C y 5% de CO₂, tras lo cual se emplearon para los siguientes experimentos.

6.3 RT-PCR

Previo al inicio del trabajo experimental, se realizó una RT-PCR dirigida hacia BVDV para descartar posibles contaminaciones de la línea celular de riñón de bovino de Madin-Darby (MDBK por sus siglas en inglés) y el suero fetal bovino (SFB, GIBCO) que se utilizó para la expansión de la cepa NADL. Para esto, se realizó la extracción de RNA de células MDBK por medio del kit de extracción: Quick-RNAtm MiniPrep de la marca Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue cuantificado con un NanoDroptm.

Posterior a eso, se procedió a realizar la RT-PCR utilizando un kit TaKaRa One step RNA PCR y los iniciadores Forward: CTAGCC ATGCCCTTAGTAGGACTAGC y Reverse: ACTCCATGTGCCATGTACAGCAGAG para amplificación de la región 5' UTR del BVDV. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 15 min y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 s, alineamiento 56°C 30 s y extensión 72°C 1 min, seguidos de una extensión final a 72°C 10 min.

Después de eso, se procedió a correr las muestras en un gel de agarosa al 1.8% con SYBR DNA Stain (Jena Bioscience) durante 25 min a un voltaje de 100.

6.4 Infección, expansión y titulación de la cepa NADL

Se infectaron células MDBK (4 botellas de 75 cm²) con la cepa NADL y se mantuvieron con medio de infección (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM por sus siglas en inglés), al 2% de SFB durante 4 días. Diariamente se observó la presencia de desprendimiento y/o vacuolización de la línea celular.

Tras transcurrir 96 horas, se obtuvieron las partículas virales por medio de lisis celular a partir de 3 ciclos de congelación y descongelación consecutivos, en los que las cajas con las células infectadas fueron colocadas en un congelador a menos 20 °C. Una vez transcurridos 26 minutos y con una congelación completa del medio de cultivo, las cajas fueron colocadas a temperatura ambiente hasta su completa descongelación para dar paso al siguiente ciclo.

Tras la lisis celular, se procedió a realizar la recolección de los sobrenadantes en un tubo de fondo cónico de 50 ml y se llevó a cabo una centrifugación a 1811Xg durante 10 minutos para eliminar los detritos celulares y obtener sólo el medio con las partículas virales. Posterior a esto, el sobrenadante se colocó en viales de 1 ml y se almacenaron en ultracongelación hasta realizar la titulación viral.

Para la titulación se usaron placas estériles de 96 pozos, donde se sembraron 100,000 células MDBK por pozo con medio de infección y se realizaron diluciones seriadas decuples y quíntuples de los sobrenadantes obtenidos en la expansión viral. Se dejó la placa en incubadora a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas para posteriormente fijar y teñir las células con cristal violeta, evidenciando el efecto citopático, y realizando el cálculo de título viral por medio del método de Reed and Muench.

6.5 Glibenclamida

La glibenclamida utilizada correspondió a la comercializada por la compañía Santa Cruz Biotechnology, con número de catálogo 10238-21-8, con una pureza $\geq 98\%$ y PM de 494.0, utilizando DMSO como vehículo.

6.6 Ensayo de citotoxicidad por medio de LDH

Se realizaron ensayos de lactato deshidrogenasa (LDH por sus siglas), a partir del kit comercial The CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (PROMEGA), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, para determinar el potencial citotóxico de algunos inhibidores de la secreción de IL-1 β que se usaron en diferentes ensayos, como CRID3 a una concentración de 50 μM y glibenclamida a concentraciones de 1, 100 y 1000 μM .

6.7 Ensayo de viabilidad celular por medio de MTT

Se realizaron ensayos de viabilidad celular a partir del uso de Bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT por sus siglas en inglés) viable para cultivo celular, de la marca Sigma-Aldrich (número de catálogo: M5655). Para el ensayo se sembró una placa de 24 pozos, con 300,000 macrófagos cada uno. Se seleccionarán al menos 2 pozos para cada una de las concentraciones de glibenclamida, las cuales son 10, 25, 50 y 100 μM inoculadas en 500 μl de RPMI al 10% de SFB. La placa se dejó incubando a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. A las 20 horas, se agregaron 20 μl de MTT en cada pozo y la placa se dejó en incubación las 4 horas restantes en las condiciones antes mencionadas.

A las 24 horas, se retiraron los sobrenadantes y se agregaron 300 μl a cada pozo de la disolución para formazan (HCL a 4 μM , Triton X-100 al 0.1%, e isopropanol). Se esperaron 5 minutos para la disolución de los cristales y se recolectaron los sobrenadantes

[21]

en tubos de 1.5 ml para centrifugar a 452Xg durante 10 minutos. Posterior a eso, se colocaron los sobrenadantes en una placa de 96 pozos, para su lectura en el espectrofotómetro a 570 nm.

6.8 Ensayos de inhibición de la secreción de IL-1 β con glibenclamida en macrófagos infectados con la cepa citopática NADL del virus de diarrea viral bovina.

Se sembró una placa de 24 pozos de ultra baja adherencia con macrófagos y cada pozo contó con 300,000 células. Para las infecciones con la cepa NADL, se trabajó con una multiplicidad de infección (MOI) 2:1, siendo el control negativo el medio RPMI al 10% de SFB y el control positivo correspondió a macrófagos estimulados con LPS a una concentración de 3 μ g/ml (*E. coli* O26:B6, Sigma-Aldrich, número de catálogo L8274).

Previo a la infección, durante 2 horas se llevó a cabo la incubación de los macrófagos con glibenclamida a una concentración de 10, 25, 50 y 100 μ M en 500 μ l de medio RPMI con 10% de SFB. Transcurridas las 2 horas de incubación, se retiró el medio y se llevó a cabo la infección con la cepa NADL a una MOI de 2:1.

Posterior a las 2 horas de infección, se retiró el medio y se añadió glibenclamida a las concentraciones antes mencionadas en 500 μ l de medio RPMI con 10% de SFB y la placa se dejó incubación a una temperatura de 37 °C y 5% de CO₂, durante 24 horas. Al día siguiente se recolectaron los sobrenadantes para llevar a cabo la medición de IL-1 β y la titulación viral por el método de Reed and Muench.

6.9 Cuantificación de IL-1 β

La cuantificación de IL-1 β en los sobrenadantes colectados se realizó por medio del kit comercial de ELISA para IL-1 β de bovino (IL-1 beta Bovine Uncoated ELISA Kit® INVITROGEN), siguiendo el protocolo del fabricante.

6.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa Graphpad Prism versión 8.0, haciendo uso del análisis de varianza de un factor (ANOVA) junto con la prueba de Tukey para establecer diferencia estadística entre los diferentes tratamientos con una $p < 0.05$. En el caso del análisis estadístico para el título viral se hizo uso de una prueba t de student con una $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Establecimiento del modelo de infección

Lo primero que se realizó, fue la obtención de monocitos de sangre periférica y su posterior incubación con medio RPMI al 10% de SFB durante 12 días, hasta su maduración en macrófagos para proceder a los ensayos de infección (Figura 1a).

Durante el período de maduración de monocitos a macrófagos, se realizó una RT-PCR dirigida hacia BVDV para identificar la posible contaminación de la línea celular MDBK y el SFB que se utilizarían para la expansión de la cepa NADL. Para esto, se realizó la extracción de RNA de las células que iban a utilizarse en la infección. Como puede observarse, las células seleccionadas (pase #16) eran libres de BVDV al igual que el SFB que se utilizó para cultivo celular durante todo el proceso experimental (Figura 1b). Posterior a esto, se procedió a infectar a las células MDBK con la cepa NADL. Se utilizaron células libres de infección como control negativo y el efecto citopático se comprobó diariamente hasta las 96 horas, cuando se observó la vacuolización de las células y se alcanzó un desprendimiento de la monocapa de al menos el 20%. Se procedió a la recolección de las partículas virales para la posterior titulación del stock viral (Figura 1c).

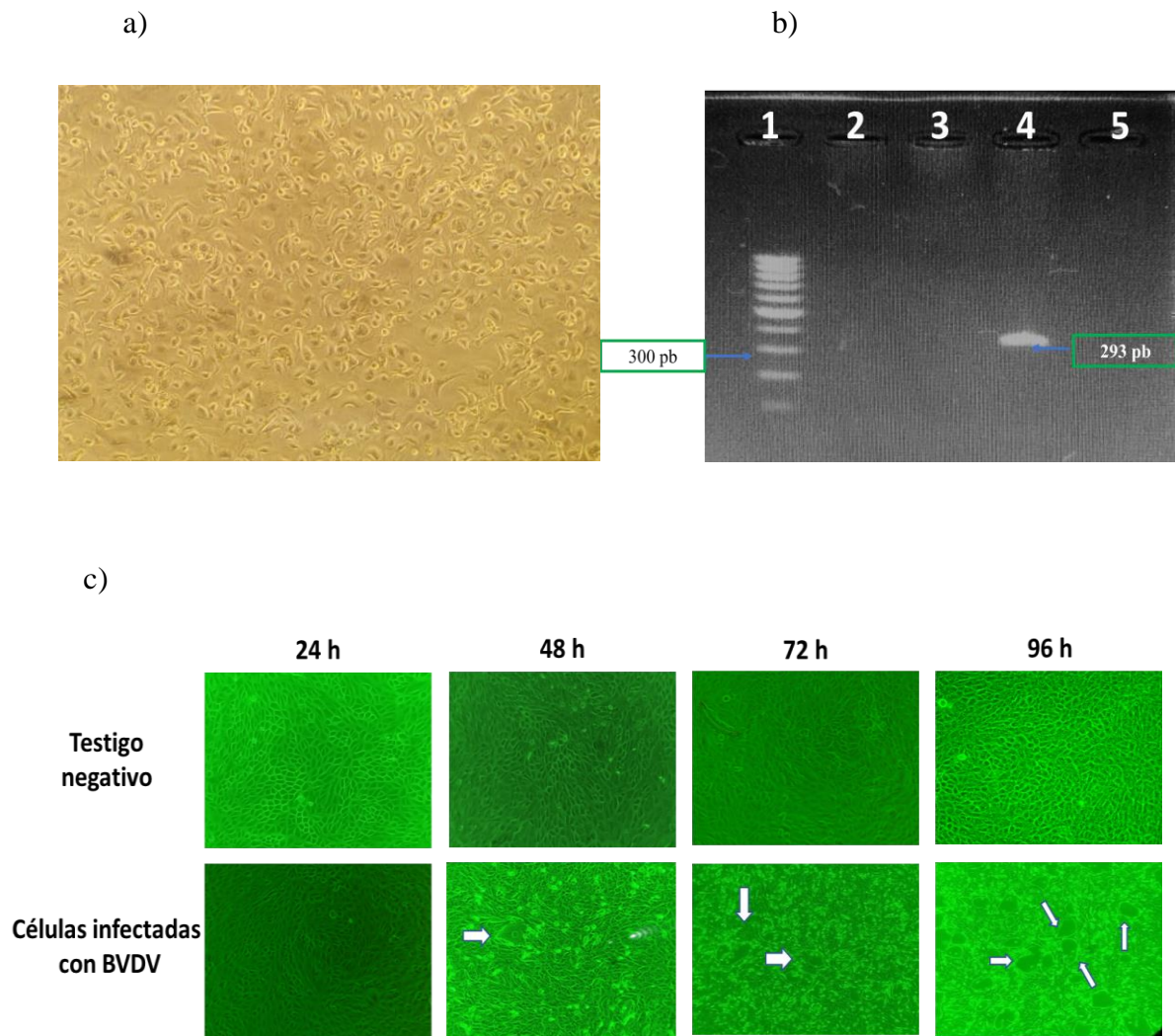


Figura 1. Obtención de macrófagos de bovino derivados de monocitos de sangre periférica y expansión de la cepa NADL. a) Macrófagos de bovino derivados de monocitos de sangre periférica. Se muestra imagen representativa de los macrófagos en microscopía de campo claro a los 12 días de maduración (objetivo 10x). b) Línea celular y suero fetal bovino libres de BVDV. Resultados de la RT-PCR de la región UTR 5' del BVDV. Carril 1, marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2, SFB. Carril 3, Testigo negativo: Células MDBK libres de BVDV. Carril 4, Testigo positivo: Células MDBK infectadas con cepa NADL de BVDV (293 pb). Carril 5, Pase #16 de células MDBK. c) Expansión de la cepa NADL en la línea celular MDBK. Se observan imágenes representativas en microscopía con filtro del testigo negativo y de las células infectadas con la cepa NADL a las 24, 48, 72 y 96 h. Las flechas blancas señalan los sitios de desprendimiento de la monocapa que

[24]

se hicieron evidentes a las 48h. A partir de las 72 h se observa una marcada pérdida de la conformación y morfología celular. (Objetivo 20X).

Una vez expandida la cepa NADL, se procedió a realizar la titulación del stock viral por medio del método de Reed and Muench. En el cuadro 1, se observa el resumen del cálculo de cada uno de los viales del stock.

Reed and Muench	Título viral	Partícula virales/ml	Promedio del stock
1er. ensayo	$10^{6.8}$	6,309,573	2,865,074 PV/ml
2do. ensayo	$10^{6.28}$	1,905,460	
3er. ensayo	$10^{5.58}$	380,189	

Cuadro 1. Resultados de la cuantificación del título viral por medio del método de Reed and Muench. Se escogieron al azar 3 viales del stock viral, los cuales fueron inoculados a partir de diluciones décuples en placas de 96 pozos, sembradas con células MDBK. Al final, se realizó un promedio de los 3 resultados obtenidos para determinar el título viral del stock completo.

7.2 Ensayos de citotoxicidad

Antes de llevar a cabo los ensayos de infección con glibenclamida, fue necesario determinar el potencial citotóxico del fármaco en el modelo de macrófago de bovino, haciendo uso de ensayos de LDH para evidenciar la pérdida de integridad de la membrana (Figura 2). Como se observa en la gráfica, el testigo negativo tiene una liberación basal de LDH de 24%, mientras que las concentraciones de glibenclamida comprendidas entre

el rango de 1 a 100 μM tienen un porcentaje de liberación de LDH de 27% y 43% respectivamente, a diferencia de la concentración de 1000 μM donde la LDH liberada es de 144%. Las concentraciones de 1 a 100 de glibenclamida no muestran diferencia estadística con el testigo negativo, por lo tanto se concluyó que dichas concentraciones carecían de citotoxicidad.

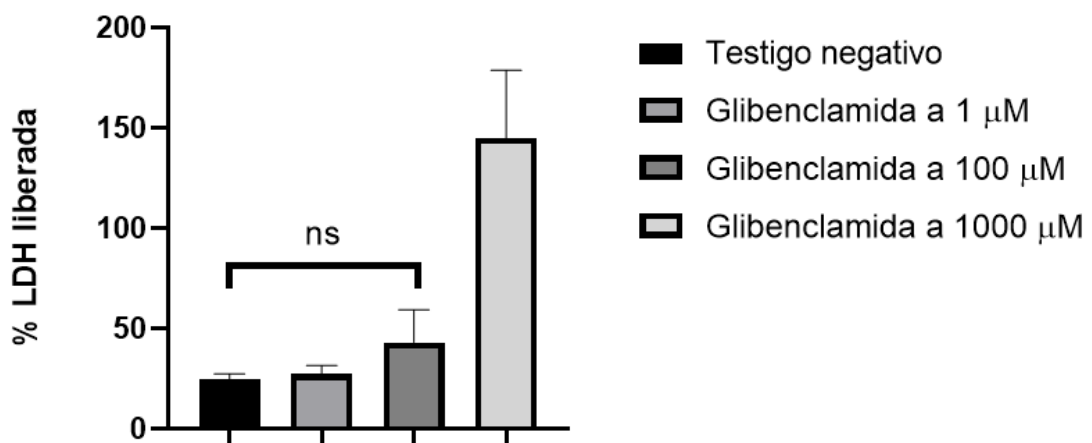


Figura 2. Efecto citotóxico de la glibenclamida en el modelo de macrófago de bovino. Se seleccionaron al menos 2 pozos para cada una de las concentraciones de glibenclamida y se incubaron durante 24 h, el testigo negativo corresponde a medio RPMI al 10% de SFB. Las barras muestran los promedios junto con la desviación estándar. Los resultados graficados corresponden a 2 ensayos independientes con 2 réplicas internas de cada variable, $p < 0.05$, utilizando un Análisis de Varianza (ANOVA) con el programa GraphPad Prism 8. 0.1. NS: Sin diferencia estadística.

7.3 Ensayos de viabilidad celular

Una vez que se determinó que las concentraciones de glibenclamida carentes de citotoxicidad iban del rango de 1 a 100 μM , se procedió a realizar ensayos de reducción

de sales de tetrazolio (MTT) (Figura 3). El testigo negativo representa el 100% de viabilidad celular. La concentración a 100 μM de glibenclamida disminuye un 13% la viabilidad celular, pero carece de diferencia estadística.

Como se observa, las 4 concentraciones de glibenclamida seleccionadas, no tienen ningún efecto sobre la viabilidad celular, por lo cual fueron seleccionadas para los ensayos de inhibición de secreción de IL-1 β .

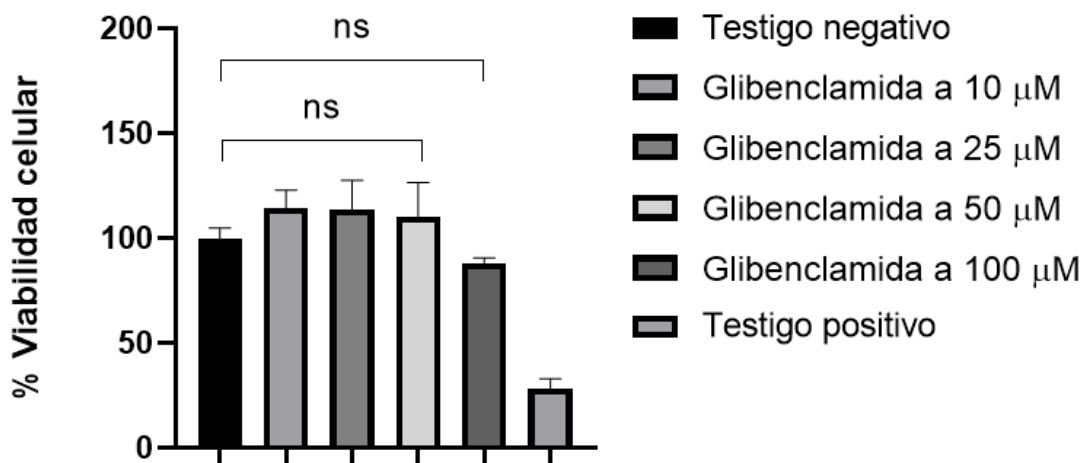


Figura 3. Efecto de la glibenclamida sobre la viabilidad celular en el modelo de macrófago de bovino. Para cada ensayo independiente se utilizó una placa de 24 pozos, con 300,00 macrófagos sembrados en cada uno. Los resultados graficados muestran la media junto con la desviación estándar de 2 ensayos independientes con 2 réplicas internas de cada variable, $p < 0.05$, utilizando un Análisis de Varianza (ANOVA) con el programa GraphPad Prism 8. 0.1. NS: Sin diferencia estadística. CRID3: Testigo positivo de inhibición. Testigo negativo: Medio RPMI al 10% de SFB. Testigo positivo: Peróxido de hidrógeno.

Con las dos figuras anteriores se comprobó que la glibenclamida carece de efecto citotóxico y no modifica la viabilidad celular en un rango de concentraciones de 1 a 100 μM

[27]

7.4 Ensayos de inhibición de la secreción de IL-1 β con glibenclamida en macrófagos infectados con la cepa citopática NADL del virus de diarrea viral bovina.

Lo siguiente fue determinar si la glibenclamida a las concentraciones de 10, 25, 50 y 100 μ M inhibían la secreción de IL-1 β en macrófagos de bovino. Para esto, se validó el modelo de secreción de IL-1 β utilizando LPS como testigo positivo, CRID3 como control de inhibición y glibenclamida a las concentraciones antes mencionadas. Como se observa, el LPS es capaz de estimular una secreción promedio de 4186 pg/ml de IL-1 β , mientras que el uso de CRID3, durante la estimulación con LPS, disminuye la secreción por debajo del valor de sensibilidad del kit de ELISA (31.2 pg/ml). Por otro lado, al usar glibenclamida a 50 y 100 μ M la secreción de IL-1 β fue de 457 pg/ml y 900 pg/ml, respectivamente. Con dichos resultados, se comprobó que la glibenclamida inhibe la secreción de IL-1 β de manera significativa a 50 y 100 μ M (Figura 4); estas concentraciones fueron seleccionadas para los ensayos de inhibición con la cepa NADL.

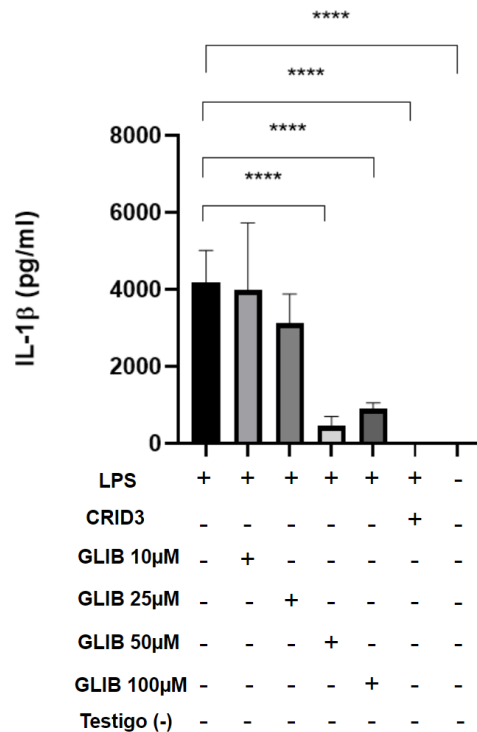


Figura 4. Validación de la secreción de IL-1 β y su inhibición en el modelo de macrófago de bovino. Los sobrenadantes se recolectaron 24 h después y la gráfica muestra la media junto con la desviación estándar de 2 ensayos independientes con 2 réplicas internas de cada variable, utilizando un Análisis de Varianza (ANOVA) con el programa GraphPad Prism 8.0.1. Los asteriscos indican una $p < 0.001$. LPS: Testigo positivo de secreción de IL-1 β , CRID3: Testigo positivo de inhibición. Testigo negativo: Medio RPMI al 10% de SFB.

Una vez seleccionadas las concentraciones de glibenclamida, se prosiguió a realizar los ensayos de inhibición con la cepa NADL (Figura 5). La cepa NADL indujo una secreción promedio de 4020 pg/ml de IL-1 β . La incubación con glibenclamida a 50 μ M previa a la infección con la cepa NADL disminuyó la secreción de IL-1 β a 3464 pg/ml, careciendo de significancia estadística. Sin embargo, la concentración a 100 μ M de glibenclamida, disminuyó hasta 788 pg/ml la secreción de IL-1 β inducida por la infección con el virus,

indicando que la secreción de IL-1 β por la infección con la cepa NADL sólo disminuye de manera significativa a dicha concentración.

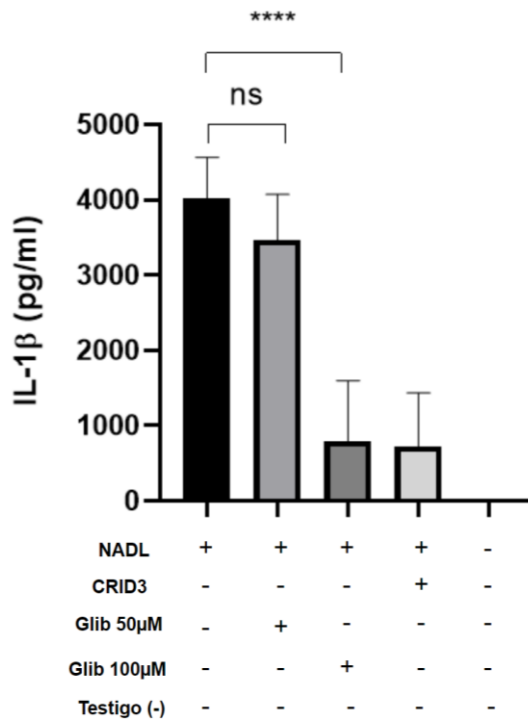


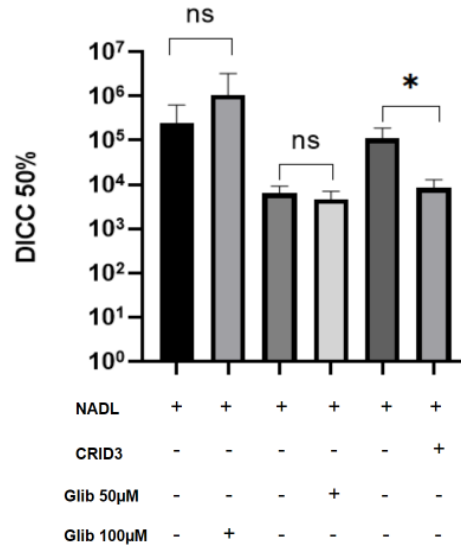
Figura 5. Efecto de la glibenclamida sobre la secreción de IL-1 β estimulada por la infección con la cepa NADL del BVDV. Para cada ensayo independiente se utilizó una placa de 24 pozos, con 300,000 macrófagos sembrados por cada uno. El inhibidor se incubó 2 horas antes de la infección con la cepa NADL a una MOI 2:1. Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 h y se cuantificó la secreción de IL-1 β por medio de ELISA. La gráfica muestra la media junto con la desviación estándar de 3 ensayos independientes con 2 réplicas internas de cada variable, utilizando un Análisis de Varianza (ANOVA) con el programa GraphPad Prism 8. 0.1. Los asteriscos indican una $p < 0.001$. CRID3: Testigo positivo de inhibición, Testigo negativo: Medio RPMI al 10% de SFB.

7.5 El uso de glibenclamida y su efecto en el título viral

Por último, se realizaron los ensayos correspondientes a la titulación viral por medio del método de Reed and Muench. Para ello, se seleccionaron los sobrenadantes obtenidos durante los experimentos de inhibición de secreción de IL-1 β con glibenclamida a 50 y 100 μ M (Figura 6a y 6b) y se realizó la infección a diluciones triples y quintuples, respectivamente. En cuanto al título viral sin tratamiento, se obtuvo un promedio de 6231 partículas virales/ml ($10^{3.79}$), mientras que en presencia de glibenclamida a 50 μ M se obtuvo un promedio de 4561 partículas virales/ml ($10^{3.65}$), sin significancia estadística. En los ensayos realizados a 100 μ M de glibenclamida se obtuvo que sin el tratamiento con glibenclamida se tiene un título viral promedio de 240,237 partículas virales/ ml ($1 \times 10^{5.38}$), por otro lado, el uso del fármaco a esa concentración durante la infección de los macrófagos de bovino con la cepa NADL, tiene un título viral promedio de 1,040,254 partículas virales/ ml ($1 \times 10^{6.01}$).

En cuanto al tratamiento con CRID3 a 10 μ M se tiene un título viral promedio de 5584 partículas virales/ ml ($1 \times 10^{3.74}$), mientras que sin tratamiento se obtuvo un título viral promedio de 86,143 partículas virales/ ml ($1 \times 10^{4.93}$). Como se observa, la inhibición con CRID3 disminuye de manera significativa el título viral a diferencia del tratamiento con glibenclamida.

a)



b)

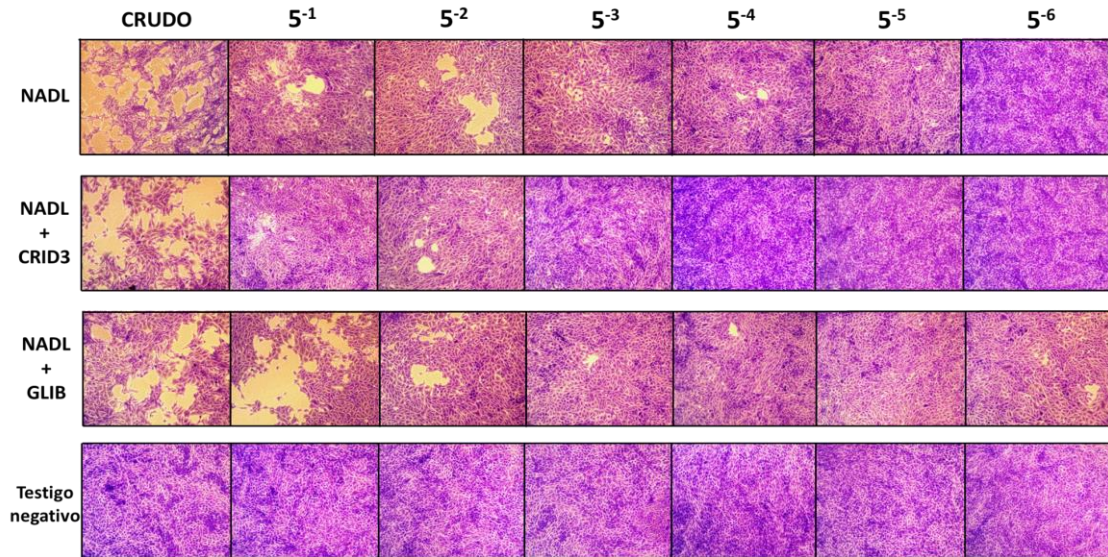


Figura 6. Uso de glibenclamida y su efecto en el título viral. Para el cálculo del título viral en presencia del inhibidor, se utilizaron los sobrenadantes de los ensayos de inhibición a 50 y 100 µM de glibenclamida. a) La gráfica muestra la media junto con la desviación estándar de 3 ensayos independientes con 3 réplicas internas de cada variable,

utilizando una prueba de T de student con el programa GraphPad Prism 8. 0.1. El asterisco indica una $p < 0.05$. CRID3: Testigo positivo de inhibición. DICC 50%: Dosis infectante en cultivo celular al 50%. b) Efecto citopático generado por BVDV. Se muestran imágenes representativas del efecto citopático originado por la cepa NADL, 72 horas post-infección. Las células fueron fijadas con cristal violeta a dicho tiempo y posteriormente se realizó el cálculo por medio del método de Reed and Muench. Testigo negativo, células sólo incubadas con DMEM al 2% de SFB. Crudo, células infectadas con la cepa NADL, sin dilución. Los números indican las diluciones en las que se observó efecto citopático. El experimento fue realizado con 3 réplicas independientes. Microscopía de fondo claro sin filtro (objetivo 10X).

8. DISCUSIÓN

La glibenclamida es un fármaco utilizado principalmente para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2. Debido a su mecanismo de acción se ha descubierto que participa en la regulación del proceso inflamatorio⁶⁷. Actualmente, se conoce que la cepa NADL del BVDV induce la secreción de IL-1 β , una citocina pro-inflamatoria relacionada con la fase aguda de la inflamación. La inhibición de la secreción de esta citocina, se ha relacionado con un menor título viral durante la infección *in vitro*^{41,55}. Los resultados de este proyecto indican que la glibenclamida inhibe de manera significativa la secreción de IL-1 β inducida por la cepa NADL del BVDV al infectar macrófagos de bovino. Sin embargo, el uso de glibenclamida durante la infección *in vitro* no disminuye el título viral.

Desde 1986, la glibenclamida ha sido comercializada como tratamiento. A pesar de estar presente en el mercado, diversos estudios han demostrado que induce muerte celular apoptótica *in vitro*⁶⁸. En la línea celular RIN-5F induce una mayor producción de nitritos y disminución de la viabilidad celular a un 74.5%⁶⁸. En la línea celular MIN6, aumenta

la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) e induce apoptosis⁶⁹.

Todos estos hallazgos, nos llevaron a determinar si el uso de glibenclamida en el modelo tenía un efecto similar. Como se determinó, la concentración de glibenclamida entre 1 y 100 μM no modifica la permeabilidad de la membrana celular ni tampoco disminuye la actividad metabólica, por lo tanto, se concluye que la glibenclamida no induce citotoxicidad en el macrófago bovino.

Nuestros resultados concuerdan con otros modelos de infección con células fagocíticas. Fan y colaboradores descubrieron que la incubación con glibenclamida a 10 μM en monocitos de sangre periférica infectados con CSFV no tiene efecto negativo en la viabilidad celular⁵³. Por otro lado, Negash y colaboradores utilizaron glibenclamida a una concentración de 200 μM en células THP-1 infectadas con el virus de hepatitis C (HCV por sus siglas en inglés), sin reportes de daño celular⁵².

Las células fagocíticas, especialmente los macrófagos, son células especializadas en producir grandes cantidades de ROS para la destrucción de microorganismos⁷⁰. Debido a esto, cuentan con mecanismos especializados para evitar el daño por la generación de ROS. Una de las vías descritas es el eje Mst-Nrf2, en el cual la generación de ROS promueve la transcripción de una variedad de genes antioxidantes, evitando el daño celular⁷⁰. Esto podría explicar el por qué los macrófagos y otras células fagocíticas son resistentes al uso de glibenclamida.

El LPS es un ligando del receptor tipo Toll 4 (TLR4 por sus siglas en inglés) y es capaz de inducir la activación del inflamasoma NLRP3⁷¹. De acuerdo con esto, se observa que el LPS desencadena la secreción de IL-1 β en macrófago de bovino, mientras que el uso de CRID 3 disminuye de manera significativa la secreción de la citocina inducida por este

ligando. CRID 3 actúa a nivel del dominio NACHT del NLRP3, inhibiendo su función de ATPasa y evitando la oligomerización del inflamasoma.

Lo mismo ocurre al utilizar LPS para inducir la secreción de IL-1 β en macrófagos incubados con glibenclamida a diferentes concentraciones. En estos ensayos sólo las concentraciones a 50 y 100 μ M de glibenclamida, disminuyeron de manera significativa la secreción de IL-1 β por lo que fueron seleccionadas para los ensayos de inhibición de secreción de IL-1 β con la cepa NADL.

La cepa NADL induce la secreción de IL-1 β , sin embargo, la secreción sólo disminuyó de manera significativa a la concentración de 100 μ M. La respuesta al efecto que se observó durante el desarrollo experimental puede estar relacionado con el inhibidor y el blanco al que está dirigido. La glibenclamida actúa corriente arriba del inflamasoma NLRP3, a diferencia de otros inhibidores como CRID 3 o Y-VAD, cuyos blancos son componentes específicos y estructurales del inflamasoma^{41,55}. Por otro lado, existe diferencia entre los estímulos utilizados para inducir la actividad del inflamasoma NLRP3. Midtbö y colaboradores determinaron que la actividad de caspasa 1 era diferente al utilizar quitosano, ATP y óxido de silicio⁷². Con base en esto, pueden existir diferencias entre la concentración a la que se inhibe la secreción de la IL-1 β inducida por LPS y por el virus.

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se comprobó que el uso de Y-VAD, un inhibidor específico de caspasa 1, disminuye la secreción de IL-1 β y el título viral durante la infección con la cepa NADL en macrófagos de bovino⁴¹. Posterior a esto, se concluyó que el uso de un inhibidor del NLRP3, conocido como CRID3, inhibió de manera significativa la secreción de IL-1 β y el título viral⁵⁵. A diferencia de esos resultados, los nuestros indican que la inhibición corriente arriba del inflamasoma NLRP3, con

glibenclamida, no tiene ningún efecto sobre el título viral, como se observa en la figura 9. Tomando en cuenta lo anterior, podría sugerirse que la cepa NADL del BVDV utiliza los componentes del inflamasoma para replicarse.

Actualmente se conoce que algunos virus utilizan las caspasas celulares para favorecer su replicación⁷³. En el caso de HCV, se conoce que la proteína viral NS5A es escindida por caspasas, permitiendo que uno de los productos del corte se trasloque al núcleo, modulando la transcripción genética y la respuesta inflamatoria⁷³. En la cepa C de CSFV, se comprobó que caspasa 6 causaba un corte proteolítico de la proteína NS5A. La inhibición de dicha escisión trae como consecuencia una disminución de la replicación del virus⁷⁴. Por otra parte, la activación del inflamasoma NLRP3 durante infecciones virales, tiene una participación moduladora. En el caso de CSFV, se ha determinado que la infección de PBMC's activa el inflamasoma NLRP3, mientras que la inhibición de éste, promueve un aumento en el título viral⁵³. El virus de fiebre aftosa (FMDV por sus siglas en inglés) también promueve el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 y éste, a su vez, ejerce un efecto protector, similar al observado en CSFV⁷⁵. En el BVDV, ocurre lo contrario ya que la actividad del inflamasoma NLRP3 parece favorecer su replicación^{41,55}. Actualmente se desconoce si alguna caspasa podría estar involucrada en el corte de las proteínas virales de este virus pero con los resultados obtenidos, podría sugerirse que el virus necesita del ensamblaje del inflamasoma NLRP3 y la actividad de caspasa 1 para favorecer su replicación, como pasa con otros miembros de la familia *Flaviviridae*.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el uso de glibenclamida y la replicación viral, podrían estar relacionados con el mecanismo de acción del fármaco y su efecto sobre el flujo de iones. Como se ha descrito previamente, la glibenclamida inhibe el eflujo de potasio lo que a su vez favorece la movilización de Ca^{2+} intracelular⁷⁶. Algunos virus de

la familia *Flaviviridae* utilizan el Ca^{2+} durante su replicación debido a la formación de complejos de replicación en membranas intracelulares derivadas de retículo endoplásmico (ER, por sus siglas en inglés), que es el mayor reservorio de Ca^{2+} intracelular⁷⁷. Tal es el caso del virus de encefalitis japonesa (JEV), donde se comprobó que algunos fármacos antagonistas de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, disminuyen el título viral de 4 a 5 unidades logarítmicas. Asimismo, se comprobó que la inhibición de estos canales tenía el mismo efecto en el título viral de zika⁷⁷. Debido a esto, puede sugerirse que la cepa NADL del BVDV podría estar utilizando la movilización de Ca^{2+} generada por la glibenclamida para su replicación o bien activar al inflammasoma a través de esta vía.

Hasta el momento, la glibenclamida no había sido probada en el modelo de macrófago de bovino como un inhibidor de la secreción de IL-1 β , pero con los resultados anteriores se concluye que tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de la citocina al igual que en otros modelos como PBMC's de cerdo y líneas celulares como la THP1^{52,53}.

9. CONCLUSIONES

En este proyecto, se confirmó que la cepa NADL del BVDV induce la secreción de IL-1 β en el modelo de macrófago de bovino. Por otro lado, se determinó que el uso de glibenclamida a una concentración de 100 μM durante la infección con la cepa NADL a una MOI 2:1 es suficiente para disminuir la secreción de la citocina. Debido a esto, se sugiere que la glibenclamida podría tener propiedades antiinflamatorias durante la infección viral. Sin embargo, a pesar de que disminuye la secreción de IL-1 β , como otros inhibidores previamente utilizados con la misma cepa, no se encontró una disminución estadísticamente significativa del título viral.

[37]

Esto plantea la posibilidad de que el virus utilice los componentes estructurales del inflammasoma NLRP3, por lo que podría sugerirse el uso de inhibidores que actúan directamente sobre estos, como se ha hecho con CRID3, para disminuir el título viral.

10.REFERENCIAS

- 1.-Neill JD. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*. 2013 Jan;41(1):2-7. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.07.002. Epub 2012 Aug 11. PMID: 22884672
- 2.- Al-Kubati AAG, Hussen J, Kandeel M, Al-Mubarak AIA, Hemida MG. Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune Response, and Vaccines Development. *Front Vet Sci*. 2021 May 14;8:475.
- 3.- Chang L, Qi Y, Liu D, Du Q, Zhao X, Tong D. Molecular detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus in Western China. *BMC Vet Res* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jan 11];17(1):1–7. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-021-02747-7>
- 4.-Darweesh M.F, Rajput M.K, Braun L.J, Ridpath J.F, Neill J.D, Chase C.C. Characterization of the cytopathic BVDV strains isolated from 13 mucosal disease cases arising in a cattle herd. *Virus Res* [Internet]. 2014 [citado 20 octubre 2021]; 195, 141–147. doi: 10.1016/j.virusres.2014.09.015.

[38]

- 5.-Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res.* [Internet]. 2010 [citado 18 octubre 2022];41(6):44. doi: 10.1051/vetres/2010016.
- 6.-Rajput M. K. S, Abdelsalam K, Darweesh M. F, Braun L. J, Kerkvliet J, Hoppe A. D, et al. Both cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) induced autophagy at a similar rate. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2017 [citado 18 octubre 2021]; 193-194, 1–9. doi:10.1016/j.vetimm.2017.09.006
- 7.-Newcomer BW. 75 years of bovine viral diarrhoea virus: Current status and future applications of the use of directed antivirals. *Antiviral Res* [Internet]. 2021 dic 1 [citado 2023 ene 11];196. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34742739/>
- 8.- Goyal S, Ridpath J. *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. Iowa (USA): Blackwell Publishing; 2005.
- 9.- Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *The Veterinary Journal*. 2014 feb 1;199(2):201–9.
- 10.- Maurer K, Krey T, Moennig V, Thiel HJ, Rüménapf T. CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhoea Virus. *J Virol* [Internet]. 2004 feb 15 [citado 2023 ene 11];78(4):1792–9. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jvi>
- 11.- Liebler-Tenorio EM, Greiser-Wilke I, Pohlenz JF. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch Virol* [Internet]. 1997 [citado 2023 ene 11];142(8):1613–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9672623/>

12.-Brogden KA, Guthmiller JM. Polyviral Diseases. 2002 [citado el 9 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6797/>

13.-Khodakaram-Tafti A, Farjanikish GH. Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. Iran J Vet Res [Internet]. el 1 de junio de 2017 [citado el 9 de febrero de 2023];18(3):154. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5674437/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/274437/)

14.-Oguejiofor CF, Thomas C, Cheng Z, Wathes DC. Animal Health Research Reviews Mechanisms linking bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection with infertility in cattle. 2019 [citado el 9 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S1466252319000057>

15.-McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD, Kelly R, Bielefeldt-Ohmann H, Occhio MD, et al. Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. Theriogenology [Internet]. el 1 de febrero de 2003 [citado el 9 de febrero de 2023];59(3-4):1051-66.

16.-Archbald LF, Gibson CD, Schultz RH, Fahning ML, Zemjanis R. Effects of intrauterine inoculation of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus on uterine tubes and uterus of nonpregnant cows. Am J Vet Res. Sep 1973 [citado el 9 de febrero de 2023];34(9):1133-7.

17.-Garoussi MT, Mehrzad J. Effect of bovine viral diarrhoea virus biotypes on adherence of sperm to oocytes during in-vitro fertilization in cattle. Theriogenology [Internet]. el 1 de abril de 2011 [citado el 9 de febrero de 2023];75(6):1067-75. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21220161/>

[40]

18.-Brock KV, and Stringfellow D. Comparative effects of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus on bovine blastocysts. *Theriogenology*. [Internet].1993 [citado el 9 de febrero de 2023]; 39, 196.

19.-Tsuboi T, Osawa T, Hirata TI, Kawashima K, Kimura K, Haritani M. Experimental infection of pregnant cows with noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus between days 26 and 50 postbreeding. *Res Vet Sci* [Internet]. junio de 2013 [citado el 9 de febrero de 2023];94(3):803–5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23261157/>

20.-Grooms DL. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* [Internet]. marzo de 2004 [citado el 9 de febrero de 2023];20(1):5–19. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15062471/>

21.-Blanchard PC, Ridpath JF, Walker JB, Hietala SK. An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with a bovine viral diarrhoea virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2010 [citado el 9 de febrero de 2023];22(1):128–31. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20093701/>

22.-Givens MD, Heath AM, Brock K v., Brodersen BW, Carson RL, Stringfellow DA. Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *Am J Vet Res* [Internet]. el 1 de abril de 2003 [citado el 9 de febrero de 2023];64(4):428–34. Disponible en: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/ajvr/64/4/ajvr.64.4.428.xml>

[41]

23.-Revell SG, Chasey D, Drew TW, Edwards S. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec.* Julio 1988 [citado el 9 de febrero de 2023] 30;123(5):122-5. doi: 10.1136/vr.123.5.122.

24.-Darweesh MF, Rajput MKS, Braun LJ, Ridpath JF, Neill JD, Chase CCL. Characterization of the cytopathic BVDV strains isolated from 13 mucosal disease cases arising in a cattle herd. *Virus Res.* el 2 de enero de 2015 [citado el 9 de febrero de 2023];195:141–7.

25.-Sentsui H, Nishimori T, Kirisawa R, Morooka A. Mucosal disease induced in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus by antigenically different cytopathic virus. *Arch Virol* [Internet]. 2001 [citado el 9 de febrero de 2023];146(5):993–1006. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s007050170131>

26.-Brownlie J. Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease in cattle. In *practice.* [Internet]. 1985 [citado el 9 de febrero de 2023]; 7. 195-202. 10.1136/inpract.7.6.195. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/19085434_Clinical_aspects_of_the_bovine_virus_diarrhoeamucosal_disease_in_cattle/citations

27.- Mendez E, Ruggli N, Collett MS, Rice CM. Infectious Bovine Viral Diarrhoea Virus (Strain NADL) RNA from Stable cDNA Clones: a Cellular Insert Determines NS3 Production and Viral Cytopathogenicity. *J Virol* [Internet]. 1998 jun [citado 2023 ene 11];72(6):4737. Available from: </pmc/articles/PMC110005/>

[42]

28.-Falkenberg SM, Dassanayake RP, Terhaar B, Ridpath JF, Neill JD, Roth JA. Evaluation of Antigenic Comparisons Among BVDV Isolates as it Relates to Humoral and Cell Mediated Responses. *Front Vet Sci.* 2021 jun 15;8:642.

29.- Chase CCL. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals* [Internet]. 2013 ene [citado 2023 ene 11];41(1):52–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23137817/>

30.- Victoria Capozzo A, Elia G, Gomez-Romero N, Ridpath JF, Javier Basurto-Alcantara F, Verdugo-Rodriguez A. Bovine Viral Diarrhea Virus in Cattle From Mexico: Current Status. *Frontiers in Veterinary Science* | www.frontiersin.org [Internet]. 2021 [citado 2023 ene 11];1:673577. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/la-produccion-de-carne-de-res-en->

31.- Su A, Fu Y, Meens J, Yang W, Meng F, Herrler G, et al. Infection of polarized bovine respiratory epithelial cells by bovine viral diarrhea virus (BVDV). <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1854539> [Internet]. 2021 [citado 2023 ene 11];12(1):177–87. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21505594.2020.1854539>

32.- Glew EJ, Carr B v., Brackenbury LS, Hope JC, Charleston B, Howard CJ. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *Journal of General Virology* [Internet]. 2003 jul 1 [citado 2023 ene 11];84(7):1771–80. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.18964-0>

[43]

- 33.- Chase CCL, Thakur N, Darweesh MF, Morarie-Kane SE, Rajput MK. Immune response to bovine viral diarrhoea virus—looking at newly defined targets. *Anim Health Res Rev* [Internet]. 2015 jun 8 [citado 2023 ene 11];16(1):4–14. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal-health-research-reviews/article/immune-response-to-bovine-viral-diarrhoea-virus-looking-at-newly-defined-targets/70B73979F7DAB3041128871460ED1601>
- 34.- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [citado 20 octubre 2021]; 9(6), 7204–7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208
- 35.- Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010 mar 19;140(6):805–20.
- 36.- Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1 [Internet]. 2021 ago 4 [citado 2023 ene 11];6(1):1–24. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00687-0>
- 37.-Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M. BVDV and innate immunity. *Biologicals* [Internet]. 2003 [citado 2023 ene 11];31(2):107–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12770540/>
- 38.- Song Q, Zhao X, Cao C, Duan M, Shao C, Jiang S, et al. Research advances on interferon (IFN) response during BVDV infection. *Res Vet Sci*. 2022 dic 1;149:151–8.
- 39.- Palomares RA, Brock K v., Walz PH. Differential expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during experimental infection with low or high virulence

[44]

bovine viral diarrhoea virus in beef calves. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2014 [citado 2023 ene 11];157(3–4):149–54. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24461321/>

40.- Fredericksen F, Carrasco G, Villalba M, Olavarría VH. Cytopathic BVDV-1 strain induces immune marker production in bovine cells through the NF- κ B signaling pathway. *Mol Immunol* [Internet]. 2015 jul 2 [citado 2023 ene 11];68(2 Pt A):213–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26330089/>

41.-Morales-Aguilar A, Lopez-Reyes Y, Regalado-Huitron M, Sarmiento-Silva RE, Arriaga-Pizano L, Benitez-Guzman A. The NADL strain of bovine viral diarrhoea virus induces the secretion of IL-1 β through caspase 1 in bovine macrophages. *Res Vet Sci* [Internet]. 2020 [citado 5 noviembre 2021]; 131, 131–136. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.04.014

42.- Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezme MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World* [Internet]. 2018 may 15 [citado 2023 ene 11];11(5):627. Available from: [/pmc/articles/PMC5993766/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)

43.- Bennett JM, Reeves G, Billman GE, Sturmburg JP. Inflammation-nature's way to efficiently respond to all types of challenges: Implications for understanding and managing "the epidemic" of chronic diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2018 nov 27;5(NOV):316.

44.-Martin-Sanchez F, Diamond C, Zeitler M, Gomez AI, Baroja-Mazo A, Bagnall J, et al. Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation.

[45]

Cell Death & Differentiation 2016 23:7 [Internet]. 2016 feb 12 [citado 2023 ene 11];23(7):1219–31. Available from: <https://www.nature.com/articles/cdd2015176>

45.-Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. Nature Reviews Immunology 2016 16:7 [Internet]. 2016 jun 13 [citado 2023 ene 11];16(7):407–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri.2016.58>

46.-Elizagaray ML, Gomes MTR, Guimaraes ES, Rumbo M, Hozbor DF, Oliveira SC, et al. Canonical and Non-canonical Inflammasome Activation by Outer Membrane Vesicles Derived From Bordetella pertussis. Front Immunol. 2020 ago 20;11:1879.

47.-Wang L, Sharif H, Vora SM, Zheng Y, Wu H. Structures and functions of the inflammasome engine.

48.-Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. Cell Death & Disease 2019 10:2 [Internet]. 2019 feb 12 [citado 2023 ene 11];10(2):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-1413-8>

49.-Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity.

50.-Voronov, E. Unique versus redundant functions of IL-1 α and IL-1 β in the tumor microenvironment. Front Immunol [Internet]. 2013 [citado 27 octubre 2021]; 4 (177), 1-12. doi:10.3389/fimmu.2013.00177

51.-De Sousa J. R, Azevedo R. do S. da S, Martins Filho A. J, de Araujo M. T. F, Cruz E. do R. M, Vasconcelos, B. C. B, et al. In situ inflammasome activation results in severe

[46]

damage to the central nervous system in fatal Zika virus microcephaly cases. *Cytokine* [Internet]. 2018 [citado 27 octubre 2021]; *111*, 255–264. doi:10.1016/j.cyto.2018.08.008

52.-Negash A. A, Ramos H. J, Crochet N, Lau D. T, Doehle B, Papic N, et al. IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 [citado 29 octubre 2021]; *9*(4), 1-13. doi: 10.1371/journal.ppat.1003330.

53.- Liu W, Uchiyama R, Zhang K, Chen J, Zhao M, Fan S, et al. Activation of Interleukin-1 β Release by the Classical Swine Fever Virus Is Dependent on the NLRP3 Inflammasome, Which Affects Virus Growth in Monocytes. Which Affects Virus Growth in Monocytes *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2018 [citado 2023 ene 11];*8*:225. Available from: www.frontiersin.org

54.- Fan W, Wang Y, Jiang S, Li Y, Yao X, Wang M, et al. Identification of key proteins of cytopathic biotype bovine viral diarrhoea virus involved in activating NF- κ B pathway in BVDV-induced inflammatory response. *Virulence* [Internet]. 2022 dic 1 [citado 2023 ene 11];*13*(1):1884–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36316807/>

55.-Gallegos C. Participación del inflammasoma nlrp3 en la secreción de IL-1 β y la replicación viral de vdvb citopático y no citopático durante la infección en macrófagos bovinos. [tesis de maestría]. CDMX (MEX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2022.

56.-Zahid A, Li B, Kombe A. J. K, Jin T, & Tao J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [citado 8 noviembre 2021]; *10*, 1-10. doi: 10. doi:10.3389/fimmu.2019.02538

[47]

57.- Xu S, Li X, Liu Y. *et al.* Inflammasome inhibitors: promising therapeutic approaches against cancer. *J Hematol Oncol* [Internet] 2019 [citado 9 noviembre 2022]; 12, 64 <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0755-0>.

58.-Feldman JM. Glyburide: A Second-generation Sulfonylurea Hypoglycemic Agent: History, Chemistry, Metabolism, Pharmacokinetics, Clinical Use and Adverse Effects. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1985;5(2):43–62.

59.-Hardin MD, Jacobs TF. Glyburide. *Geriatric Medicine Today* [Internet]. 2022 jun 22 [citado 2023 ene 11];9(9):63–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545313/>

60.-Tinker A, Aziz Q, Thomas A, Harvey W. The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system Correspondence Keywords ATP-sensitive potassium channel; cardiac myocyte; smooth muscle; physiology; pathophysiology. 2013 [citado 2023 ene 11]; Available from: www.brjpharmacol.org

61.- Lev JD, Zeidler A, Kumar D. Glyburide and Glipizide in Treatment of Diabetic Patients With Secondary Failures to Tolazamide or Chlorpropamide. [citado 2023 ene 11]; Available from: <http://diabetesjournals.org/care/article-pdf/10/6/679/516197/10-6-679.pdf>

62.-Pearson JG. Pharmacokinetics of glyburide. *Am J Med*. 1985 sep 20;79(3):67–71.

[48]

63.-Rydberg T, Pharm M, Jonsson A, Roder M, Melander A. Hypoglycemic Activity of Glyburide (Glibenclamide) Metabolites in Humans. *Diabetes Care* [Internet]. 1994 [citado 2023 ene 11];17(9). Available from: <http://diabetesjournals.org/care/article-pdf/17/9/1026/443062/17-9-1026.pdf>

64.- Thulé PM, Umpierrez G. Pharmacologic treatment of type 2 diabetes (a vella, section editor) Sulfonylureas: A New Look at Old Therapy.

65.-CHMP. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) CHMP assessment report. 2018 [citado 2023 ene 11]; Available from: www.ema.europa.eu/contact

66.-Kimber-Trojnar Z, Marciniak B, Patro-Malysza J, Skorzynska-Dziduszko K, Poniedzialek-Czajkowska E, Mierzynski R, et al. Is Glyburide Safe in Pregnancy? *Curr Pharm Biotechnol*. 2014 sep 30;15(1):100–12.

67.-Zhang G, Lin X, Zhang S, Xiu H, Pan C, Cui W. A Protective Role of Glibenclamide in Inflammation-Associated Injury. *Mediators Inflamm*. 2017;2017.

68.-Ansari MM, Ansari M. Nitric oxide involvement in pancreatic β cell apoptosis by glibenclamide. *Nitric Oxide*. 2006 feb 1;14(1):39–44.

69.-Sawada F, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sasaki S, Fujii M, Maeda Y, et al. Differential effect of sulfonylureas on production of reactive oxygen species and apoptosis in cultured pancreatic β -cell line, MIN6. *Metabolism*. 2008 ago 1;57(8):1038–45.

70.- Wang P, Geng J, Gao J, Zhao H, Li J, Shi Y, et al. Macrophage achieves self-protection against oxidative stress-induced ageing through the Mst-Nrf2 axis. *Nature*

[49]

Communications 2019 10:1 [Internet]. 2019 feb 14 [citado 2023 ene 11];10(1):1–16.

Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-08680-6>

71.- Ganz M, Csak T, Nath B, Szabo G. Nalp3 inflammasome in the liver. *World J Gastroenterol*. 2011;17(43).

72.- Midtbö K, Eklund D, Särndahl E, Persson A. Molecularly distinct NLRP3 inducers mediate diverse ratios of interleukin-1 β and interleukin-18 from human monocytes. *Mediators Inflamm*. 2020;2020.

73.- Connolly PF, Fearnhead HO. Viral hijacking of host caspases: an emerging category of pathogen–host interactions. *Cell Death Differ* [Internet]. 2017 [citado 2023 ene 11];24:1401–10. Available from: www.nature.com/cdd

74.- Xie J, Guo H, Gong W, Jiang D, Zhang L, Jia J, et al. Identification of cleavage of NS5A of C-strain classical swine fever virus. *Arch Virol* [Internet]. 2017 feb 1 [citado 2023 ene 11];162(2):391–400. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-016-3117-z>

75.- Zhi X, Zhang Y, Sun S, Zhang Z, Dong H, Luo X, et al. NLRP3 inflammasome activation by Foot-and-mouth disease virus infection mainly induced by viral RNA and non-structural protein 2B. *RNA Biol* [Internet]. 2020 mar 3 [citado 2023 ene 11];17(3):335–49. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15476286.2019.1700058>

76.- Gromada J, Dissing S, Kofod H, Frøkjær-Jensen J. Effects of the hypoglycaemic drugs repaglinide and glibenclamide on ATP-sensitive potassium-channels and cytosolic

[50]

calcium levels in beta TC3 cells and rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* [Internet]. 1995 [citado 1 agosto 2022]; 38(9):1025-32. doi: 10.1007/BF00402171.

77.- Charlton FW, Pearson HM, Hover S, Lippiat JD, Fontana J, Barr JN, Mankouri J. Ion Channels as Therapeutic Targets for Viral Infections: Further Discoveries and Future Perspectives. *Viruses*. [Internet]. 2020 [citado 1 agosto 2022]; 12(8):844. doi: 10.3390/v12080844.