

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MODELAMIENTO *IN SILICO* DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS EN LA  
POLIPROTEÍNA DEL VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA, APROXIMACIÓN  
EVOLUTIVA Y PREDICCIÓN DEL ACOPLAMIENTO A CASPASA-1

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ISABELA RUELAS MESA

ASESORES:

Dr. Alejandro Benítez Guzmán

Dra. Yocelyn Teresa Gutiérrez Guerrero

M. en C. Héctor Daniel Nájera Rivera



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 padres, gracias por apoyarme siempre.

Gracias mamá por ser mi guía y gracias papá por ser mi primer maestro. Sin ustedes nada de esto sería posible.

A Niebla, gracias por regalarme los mejores 13 años.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme un espacio para poder completar mis estudios y cumplir mis sueños.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por todos los conocimientos adquiridos y las oportunidades para encontrar mi camino.

Al Dr. Alejandro Benítez Guzmán por guiarme en mi comienzo en la ciencia, escucharme y por la confianza brindada durante este tiempo.

A la Dra. Yocelyn Teresa Gutiérrez Guerrero por enseñarme una forma diferente de hacer ciencia, por su paciencia y enseñanzas.

Al M. en C. Héctor Daniel Nájera Rivera por sus consejos, ayuda incondicional y por su amistad y paseos.

A los integrantes del jurado, por realizar las revisiones y correcciones que me ayudaron a hacer un trabajo de calidad.

Al proyecto PAPIIT IN214121, por el financiamiento para este trabajo.

Gracias a mis papás por siempre darme todo y más, a mi hermano por ser mi compañero y amigo. Gracias a mi familia, especialmente a mi tía Liz y abuela, por acompañarme, apoyarme e impulsarme a ser mejor. Gracias abuelos por inculcarme el amor a los animales.

Gracias a mis amigos en casa que siempre me cuidaron en la distancia, Miguel, Fanny, Abel, Madián, Ximena, Anny. Gracias Aranza y Dulce por vivir esta aventura conmigo. Gracias a mis amigas en el deporte, Yuri y Ana Gaby.

Gracias a todos en el laboratorio por brindarme su amistad y risas durante mi estadía en la ciudad, Miros, Clau, Aldo, Laurita, Héctor, especialmente a Omar y Josué por las cenas y risas en Veracruz. Gracias a mis amigos de la facultad, en especial a Vale, Juan, Irina, Shay e Ingrid por hacerme sentir un poco menos foránea.

Gracias César, por darme ánimos, no dejarme caer y por todo tu cariño durante estos años.

Gracias Niebla por ser mi más grande amiga, Hera por ser la mejor almohada y Güicha por ser una gran compañerita.

## Contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	17
Objetivos específicos	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
Árboles filogenéticos	18
Modelos proteicos	19
Predicción de escisiones por caspasa-1	20
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS	65
ANEXO METODOLOGÍA	76
Árboles filogenéticos	76
Modelos proteicos	82
Predicción de escisiones por caspasa-1	86

## Contenido: Cuadros

CUADRO 1. Abreviaturas de los virus de la familia flaviviridae abarcados en este estudio.	2
CUADRO 2. Proteínas presentes en la familia <i>Flaviviridae</i> .	10
CUADRO 3. Porcentajes de identidad las proteínas de BVDV-1 comparadas con las proteínas de los virus que componen la familia <i>Flaviviridae</i> .	21
CUADRO 4. Interacciones de caspasa-1 con BVDV-1 y otros virus.	52
CUADRO 5. Secuencias utilizadas.	80
CUADRO 6. Templados utilizados.	84

## Contenido: Figuras

FIGURA 1. Poliproteína de los virus de la familia <i>Flaviviridae</i>	11
FIGURA 2. Árbol filogenético de la proteína Npro	25
FIGURA 3. Modelos proteicos de la proteína Npro	26
FIGURA 4. Alineamiento y triada catalítica de Npro	26
FIGURA 5. Árbol filogenético de la proteína C	27
FIGURA 6. Modelo proteico en listones de la proteína Erns de BVDV-1	28
FIGURA 7. Corte de caspasa-1 a la proteína Erns	28
FIGURA 8. Árbol filogenético de la proteína E1	30
FIGURA 9. Árbol filogenético de la proteína E2	31
FIGURA 10. Modelos proteicos de la proteína E2	32
FIGURA 11. Árbol filogenético de la proteína p7	33
FIGURA 12. Árbol filogenético de la proteína NS2-3	34
FIGURA 13. Modelos proteicos de la proteína NS2-3	35
FIGURA 14. Corte de caspasa-1 a la proteína NS2-3	35
FIGURA 15. Modelos proteicos del dominio Jiv de la proteína NS2-3	36
FIGURA 16. Árbol filogenético de la proteína NS3	38
FIGURA 17. Modelos proteicos de la proteína NS3	39
FIGURA 18. Comparaciones de los modelos proteicos del dominio peptidasa de NS3	41
FIGURA 19. Alineamiento y triada catalítica de NS3	42
FIGURA 20. Modelos proteicos del dominio Dead-like helicase de NS3	43
FIGURA 21. Árbol filogenético de la proteína NS4A	44
FIGURA 22. Modelos proteicos de la proteína NS4A	45
FIGURA 23. Árbol filogenético de la proteína NS4B	46
FIGURA 24. Árbol filogenético de la proteína NS5A	47
FIGURA 25. Modelos proteicos de la proteína NS5A	48
FIGURA 26. Corte de caspasa-1 a la proteína NS5A	49
FIGURA 27. Árbol filogenético de la proteína NS5B	50
FIGURA 28. Modelo proteico de la proteína NS5B	50
FIGURA 29. Modelo proteico del dominio RdRP_3 de la proteína NS5B	51

## RESUMEN

Modelamiento *In silico* de las proteínas codificadas en la poliproteína del virus de diarrea viral bovina, aproximación evolutiva y predicción del acoplamiento a caspasa-1 (bajo la dirección de: Dr. Alejandro Benítez Guzmán, Dra. Yocelyn Teresa Gutiérrez Guerrero y M. en C. Héctor Daniel Nájera Rivera)

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y presenta 12 proteínas codificadas en su poliproteína. Este virus causa grandes pérdidas económicas anuales en la producción bovina debido a abortos y diarreas. BVDV promueve la secreción de la proteína IL-1 $\beta$  que supone la activación del inflammasoma NLRP3. Se ha observado que al usar inhibidores de la enzima caspasa-1 en un cultivo celular infectado con el virus, hay una disminución en el título viral que podría significar una interacción de caspasa-1 con el virus. En este estudio se presentan las similitudes filogenéticas y estructurales de las proteínas de BVDV y otros virus miembros de la misma familia viral, para asociarlos con posibles interacciones con caspasa-1 del hospedero para inferir mecanismos de interacción con los virus de la familia *Flaviviridae*. Utilizando BLASTp, RaxML y FigTree se realizaron árboles filogenéticos donde se observó que la proteína NS3 es la más conservada dentro de la familia viral y utilizando SwissModel y Chimera se construyeron modelos proteicos por homología donde se observó que la proteína NS4A es estructuralmente la más conservada del género *Pestivirus*, para predecir interacciones de caspasa-1 se utilizó Expasy ProteinCutter donde se predijeron cortes en las proteínas Erns, NS2-3 y NS5A de BVDV. La proteína NS5A es filogenética y estructuralmente más conservada en el género *Pestivirus* y la caspasa-1 del hospedero es capaz de escindirla en el aminoácido 48 (ácido aspártico) por lo que podría relacionarse con la ejecución y regulación de la replicación viral.

Cuadro 1. Abreviaturas de los virus de la familia *Flaviviridae* abarcados en este estudio.

<b>Virus</b>	<b>Abreviatura</b>
Diarrea viral bovina 1a	BVDV-1
Atypical porcine pestivirus	APPV
Border disease virus	BDV
Culex flavivirus	CxFV
Culex theileri flavivirus	CTFV
Culiseta flavivirus	CFV
Dengue 1	DENV-1
Dengue 2	DENV-2
Dengue 4	DENV-4
Diarrea viral bovina 1 Ind S1226	BVDV1-Ind
Diarrea viral bovina 1-CP821	BVDV1-CP821
Diarrea viral bovina 1-NCP821	BVDV1-NCP821
Diarrea viral bovina 1-NCP821	BVDV1-NCP821
Diarrea viral bovina 1b	BVDV-1b
Diarrea viral bovina 2	BVDV-2
Diarrea viral bovina 2-New York '93	BVDV2-NewYork93
Diarrea viral bovina 3	BVDV-3
Diarrea viral bovina Bega	BVDV-Bega
Diarrea viral bovina Braidwood	BVDV-Braidwood
Diarrea viral bovina Rit 4350	BVDV-Rit4350
Diarrea viral bovina Trangie Y546	BVDV-Trangie
Enfermedad de las fronteras	BDV
Equine pegivirus 1	EPgV-1
Fiebre amarilla	YFV
Fiebre porcina clásica	CSFV
GB virus C	GBV-C
Hanko virus	HANKV
Haslams Creek virus	HaCV

Cuadro 1. Abreviaturas de los virus de la familia *Flaviviridae* abarcados en este estudio (continuación).

<b>Virus</b>	<b>Abreviatura</b>
Hepacivirus B	HCV-B
Hepacivirus C	HCV-C
Hepacivirus C 3	HCV-3
Hepacivirus I	HCV-I
Hepacivirus M	HCV-M
Hepatitis C 1a	HCV-1a
Hepatitis GB virus B	GBV-B
Japanese encephalitis virus	JEV
Karumba virus	KRBV
Kunjin virus	KUNV
La Tina virus	LTNV
Long Pine Key virus	LPKV
Mac Peak virus	McPV
Mercadeo virus	MECDV
Mosquito flavivirus	MFV
Nakiwogo virus	NAKV
Ochlerotatus caspius flavivirus	OCFV
Palm Creek virus	PCV
Pestivirus ovino	OvinePestivirus
Quang Binh virus	QBV
Saint Louis encephalitis	SLEV
Tamana bat virus	TABV
Tunisian sheep virus	TSV-BM01
Wenling shark virus	WLSV
West Nile virus	WNV
Zika	ZIKV

Cuadro 1. Virus abarcados en este estudio en orden alfabético (izquierda) y abreviatura utilizada en este estudio, establecida por el ICTV (derecha).

## INTRODUCCIÓN

Los métodos de experimentación *In silico* son aquellos hechos por una computadora y han sido utilizados, en los últimos años, como un apoyo para la investigación biológica. Estos métodos ayudan a hacer simulaciones rápidas y rentables para apoyar la predicción y validación de técnicas de laboratorio (Fielden *et al.*, 2002).

Existen diferentes técnicas de predicción *In silico*, una de ellas es el modelado molecular donde se evalúan diferentes moléculas biológicas y sus interacciones (Okada *et al.*, 2011). Además, ayudan a visualizar proteínas y compararlas para predecir posibles funciones en común gracias a las estructuras presentes en las mismas (Gómez *et al.*, 2019). Otra técnica es la construcción de árboles filogenéticos que han sido utilizados para elucidar los orígenes y predecir posibles relaciones evolutivas entre algunos virus u otros organismos, estos modelos son validados estadísticamente (Helma, 2004). En la actualidad, este tipo de herramientas han sido utilizadas con mayor frecuencia para poder hacer predicciones y posteriormente usar modelos animales.

Una de las áreas en la que la bioinformática ha sido importante en los últimos años es la virología. Un aporte de la bioinformática es que se han podido localizar mutaciones genéticas, identificar patógenos, descubrir nuevos virus y asociarlos a una familia y género viral, y encontrar el origen de estos mismos (Cuesta, 2020). Esta tecnología ayuda a la obtención de genomas virales, como el de SARS-CoV-2 que se pudo almacenar en bases de datos para posteriormente analizarlo y compararlo con las nuevas variantes que surgían. Esto permite encontrar similitudes y proceder a la interpretación de los datos analizando la taxonomía, composición molecular, compararla con otros virus, encontrar posibles mutaciones y realizar pruebas para buscar candidatos para vacunas y tratamientos posibles con medicamentos existentes (Ponce, 2022).

En la medicina veterinaria existen muchos virus con capacidad de producir enfermedades que causan afectaciones en la producción como es el caso del virus

de la diarrea viral bovina (BVDV). Este virus causa diarrea con sangre, fiebre, pérdida de apetito, úlceras en la boca, infertilidad y en algunos casos neumonía; algunos animales pueden morir incluso antes de empezar a presentar síntomas. En el caso de hembras gestantes, se pueden producir abortos cuando la infección ocurre en el segundo o tercer tercio de la gestación y si la infección ocurre en el primer trimestre, puede dar lugar a becerros persistentemente infectados (PI); esto se da en animales con el virus de diarrea viral bovina biotipo no citopático. BVDV produce pérdidas económicas debido a los abortos, la infertilidad y los signos clínicos, así como por el decremento en la producción de leche y al bajo crecimiento del ganado. Además, durante la recuperación de la enfermedad, el ganado es susceptible a otras enfermedades (Animal Health Diagnostic Center, 2016).

El BVDV es un virus de la familia *Flaviviridae* la cual está compuesta por cuatro géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus*. Estos virus se encuentran relacionados serológicamente entre sí y se han encontrado relaciones antigénicas que generan respuestas inmunes cruzadas (Rathore *et al.*, 2020), especialmente, entre el virus del Zika (ZIKV) y el virus del Dengue (DENV) debido a las proteínas E y NS1 (Mani *et al.*, 2018). En algunos *Pestivirus* se han reportado reacciones cruzadas entre distintos virus que podrían indicar un salto de virus entre especies (Casciari *et al.*, 2020). Algunos virus de esta familia viral son importantes en medicina humana como es el caso del Dengue (DENV) y el Zika (ZIKV) que son del género *Flavivirus*, la hepatitis C (HCV) que es un *Hepacivirus* y la hepatitis G (HGV) un *Pegivirus* (ICTV, 2021). Es por esto que se vuelve importante estudiar todas las proteínas (tabla 1), sus funciones, similitudes y diferencias para determinar si BVDV podría ser utilizado como modelo para el estudio de otros virus de interés veterinario y de salud pública.

Los virus de esta familia tienen genoma de ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla en sentido positivo, tienen una bicapa lipídica y son esféricos (Knipe, 2013). Tienen de 10 a 12 proteínas con funciones similares entre los miembros de la familia organizadas como una poliproteína, las cuales se dividen en proteínas estructurales

y no estructurales. Las proteínas estructurales son: la proteína de la cápside (C), la proteína Erns (Erns), la proteína de membrana (M), la proteína de la envoltura (E) y la proteína 7 (p7). Por otro lado, las proteínas no estructurales son: la proteína Npro (Npro), la proteína no estructural 1 (NS1), la proteína no estructural 2 (NS2), la proteína no estructural 3 (NS3), la proteína no estructural 4A (NS4A), la proteína no estructural 4B (NS4B) y la proteína no estructural 5 (NS5) (Knipe, 2013, ICTV, 2021).

La proteína C es una proteína de entre 11 y 14 kDa que se encuentra en todos los géneros de esta familia viral con algunas excepciones en los *Pegivirus*, es la primera de la poliproteína y tiene la función de formar la nucleocápside, también está implicada en el control transcripcional y la apoptosis (Knipe, 2013). Solo las variantes de Hepatitis GB (GBV) del género *Pegivirus* poseen la proteína C (Yu *et al.*, 2022). En los *Pestivirus* el extremo Amino terminal (N-terminal) de la proteína C es generado por la auto escisión de Npro y el extremo Carboxilo terminal (C-terminal) guía a la traslocación de Erns al retículo endoplásmico (ER).

La proteína Erns es una glicoproteína de 44 a 48 kDa que solo se encuentra en los *Pestivirus* y tiene la capacidad de unirse a RNA de baja afinidad que ayuda a la unión del RNA viral a RNAm de la célula. Esta proteína asocia membranas con partículas virales por su extremo C-terminal y es secretada por las células infectadas en una forma soluble que ayudará a la salida del virus de la célula. Erns tiene actividad de RNasa lo que contribuye a la inhibición de Interferón tipo I (IFN I) (Knipe, 2013).

La proteína M se encuentra en la membrana viral, pesa alrededor de 20 kDa y solo se encuentra en los *Flavivirus*. La maduración del virión es regulada por la escisión de la proteína precursora M, encontrada en la poliproteína, que posteriormente se transforma en la proteína M (Knipe, 2013).

La proteína E es una proteína estructural de envoltura que en los *Flavivirus* pesa alrededor de 53 kDa. En el caso de los *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus*, la proteína E se encuentra como E1 y E2, estas son glicoproteínas integradas en la membrana con un peso de 30 y 70 kDa, respectivamente. La proteína E2 forma homodímeros y, además, se puede relacionar con E1 para formar heterodímeros y son parte clave en la internalización del virión a la célula (Knipe, 2013) pues la proteína E2 participa directamente en la unión con receptores celulares para permitir la entrada del virus a estas (Yu *et al.*, 2022). Además, participa en el ensamblado y la gemación de los viriones (Knipe, 2013).

La proteína p7 pesa cerca de 6 kDa. En los *Pestivirus* y *Hepacivirus* no es indispensable para la replicación viral pero participa en el ensamblaje y es importante para la formación de viriones infectantes; gracias a su capacidad de formar poros, el virus puede salir de la célula. La proteína p7 es llamada p13 en los *Pegivirus* (Yu *et al.*, 2022) y cumple con la función antes mencionada (Knipe, 2013).

La Npro es una proteína no estructural que se encuentra relacionada con la virulencia del agente. Está presente únicamente en los *Pestivirus*, es una autoproteasa que se va a autoescindir de la poliproteína. Esta proteína escinde en los aminoácidos cisteína 168 y serina 169 de la poliproteína con su triada catalítica compuesta de ácido glutámico 22, histidina 49 y cisteína 69 (Knipe, 2013).

Las proteínas no estructurales son las principales encargadas de la replicación del virus. Solo los *Flavivirus* cuentan con proteína NS1 que pesa 46 kDa y es traslocada al retículo endoplásmico (ER) para poder ser escindida de NS2 de la poliproteína por una enzima propia del ER. Esta proteína localiza sitios de síntesis de RNA para poder comenzar la replicación (Knipe, 2013) del RNA sentido negativo y por lo tanto poder replicarse e infectar a la célula. Esta proteína trabaja en conjunto con las proteínas NS4A y NS4B (Edeling *et al.*, 2014).

La proteína NS2 se encuentra dividida en NS2A y NS2B en los *Flavivirus*. La proteína NS2A es hidrofóbica y pesa cerca de 22 kDa. Se encarga del ensamblaje viral además de encontrar sitios de replicación de RNA e interactuar con NS3 y NS5. La proteína NS2B es más pequeña, con un peso de 14 kDa y es una proteína asociada a membrana que forma un complejo con NS3 (Knipe, 2013). La proteína NS2 tiene un peso de 23 kDa en *Hepacivirus* y 54 kDa en *Pestivirus*, esta proteína tiene un papel en el ensamblaje viral que aún no ha sido elucidado, aunque se cree, que interactúa con p7 para llevar a cabo esto. Durante este proceso interactúa con E1, E2, NS3 y NS4A lo que hace suponer que la proteína participa en la unión de las proteínas estructurales y no estructurales (Knipe, 2013). Además, en el caso del virus de diarrea viral bovina (BVDV), participa en la escisión entre ella y NS3 en las cepas del biotipo citopático (Kameyama *et al.*, 2008). Los *Pegivirus* presentan una proteína similar a los *Hepacivirus*, aunque aún no se ha estudiado por completo su función (Yu *et al.*, 2022).

En los *Pestivirus* la proteína NS2 cuenta con un dominio Jiv que va a potencializar la escisión entre NS2 y NS3 en las cepas de biotipo citopáticas. La ausencia del dominio Jiv resulta en cepas de biotipo no citopáticas pues NS2 y NS3 no se escinden (Kameyama *et al.*, 2008). Se cree que la función de NS3 de escindir a la poliproteína viral para liberar las proteínas virales individuales permanece aun cuando no se escinde de NS2 (Tautz *et al.*, 2013). La falta de estudios en esta proteína, pero las similitudes en la función conocida, podría indicar que otros géneros además del *Pestivirus* cuentan con el dominio Jiv.

Los biotipos citopático y no citopático se encuentran en el virus de diarrea viral bovina en el que, en el biotipo citopático, existe una alteración genética en la que se inserta una región de RNA en la región de codificación para la proteína NS2-3. Esta región ocasiona el reordenamiento de las proteínas NS2 y NS3 que produce dos diferentes proteínas (NS2 y NS3) a diferencia del biotipo no citopático en la que estas se mantienen como una sola proteína (OIE Manual, 2018). Este

reordenamiento no altera las otras proteínas virales, por lo que los virus citopático y no citopático se mantienen antigénicamente similares (Bolin, 2002).

La proteína NS3 está presente en todos los géneros y es la más grande de esta familia viral. Pesa entre 70 y 80 kDa y cuenta con un dominio peptidasa en el extremo N-terminal y un dominio helicasa en el extremo C-terminal, ambos dominios son importantes para la replicación viral. El dominio peptidasa de esta proteína le confiere su actividad de proteasa y es la que contiene la triada catalítica compuesta por histidina-1658, ácido aspártico-1686, y serina-1752 (Tautz *et al.*, 2000) que escinde a la poliproteína en diferentes puntos de la poliproteína, participa en la replicación del RNA e interactúa con NS2 y NS4 o NS4A. El dominio Dead/DexH helicasa es una parte esencial para la replicación del virus pues las helicasas participan en una variedad de actividades bioquímicas que involucran DNA y RNA, incluidas la traducción, transcripción, splicing, recombinación y replicación (Warrener *et al.*, 1994). Participa en la infección viral y está implicado en el ensamblaje del virión, aunque su rol no está completamente claro (Knipe, 2013, Yu *et al.*, 2022). Estos dominios se encuentran también en los otros géneros virales.

La proteína NS4A está presente en todos los géneros virales. Pesa entre 8 y 16 kDa y tiene varias funciones en el ciclo de replicación viral e interactúa con NS3, NS4B y NS5A para los cuatro géneros. La región central de la proteína ayuda a NS3 a reconocer sustratos de RNA y en la fosforilación de NS5A, la replicación de RNA y el ensamblaje viral. En los *Pestivirus* actúa como co-factor de NS3 para la escisión de la poliproteína. En los *Flavivirus* está implicada en la replicación mediante la interacción con NS1 en la co-localización de complejos de replicación (Knipe, 2013).

La proteína NS4B, encontrada en todos los géneros de esta familia, pesa entre 27 y 38 kDa. Esta proteína localiza NS3 en los sitios de replicación de RNA, juega un

papel crítico en la organización del complejo de replicación de RNA pues rearregla membranas implicadas en esto (Knipe, 2013, Yu *et al.*, 2022).

Por último, la proteína NS5 se encuentra como NS5A y NS5B en los *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus* pero no en los *Flavivirus* donde se encuentra como NS5 y tiene la función de crear un capuchón de GTP en el RNA (Knipe, 2013). NS5A pesa entre 56 y 58 kDa, es una proteína fosforilada que participa y regula la replicación del RNA, pues se necesitan más proteínas traducidas que RNA viral para poder formar un virión (Yu *et al.*, 2022). Esta proteína ayuda a formar el complejo de replicación viral y localiza sitios de síntesis de RNA además de interactuar con NS5B (Knipe, 2013). La proteína NS5B pesa entre 68 y 75 kDa, contiene la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) que es responsable de la replicación viral en sentido positivo (Choi *et al.*, 2006, Yu *et al.*, 2022). Estas proteínas son muy similares en toda la familia viral en cuanto a sus funciones, conformación, tamaño y nombre, sin embargo, existen algunas excepciones (Cuadro 2, Figura 1).

Las proteínas son muy similares en toda la familia viral en cuanto a sus funciones, conformación, tamaño y nombre, sin embargo, existen algunas excepciones. En el Cuadro 2 se observan las proteínas que tiene cada género y en la Figura 1 se observan las poliproteínas de los diferentes géneros virales.

Cuadro 2. Proteínas presentes en la familia *Flaviviridae*.

Proteína	Género			
	<i>Flavivirus</i>	<i>Pestivirus</i>	<i>Hepacivirus</i>	<i>Pegivirus</i>
Proteína Npro		X		
Proteína C	X	X	X	X
Proteína Erns		X		
Proteína M	X			
p7		X	X	p13
E	X	E1, E2	E1, E2	E1, E2
NS1	X			

NS2	NS2A, NS2B	X	X	X
NS3	X	X	X	X
NS4A	X	X	X	X
NS4B	X	X	X	X
NS5	X	NS5A, NS5B	NS5A, NS5B	NS5A, NS5B

Cuadro 2. Proteínas presentes en la familia *Flaviviridae*. La identificación con una X muestra las proteínas que están presentes en cada género, en algunos casos las proteínas se encuentran presentes con otros nombres.

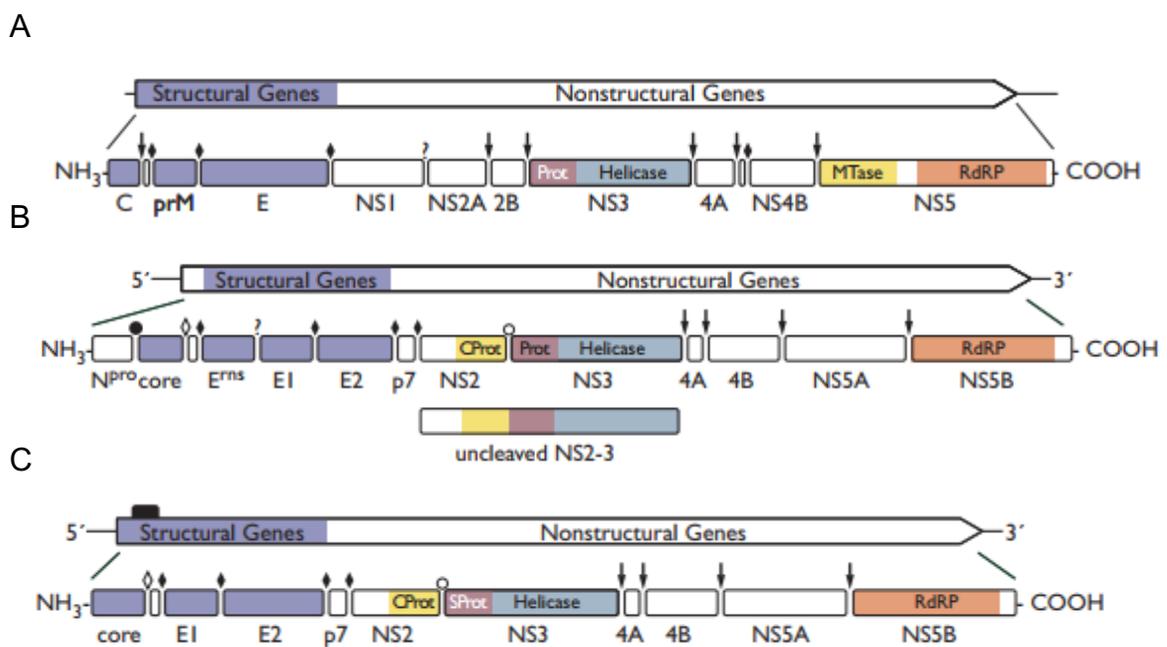


Figura 1. Poliproteína de los virus de la familia *Flaviviridae*. A. Poliproteína de los virus del género *Flavivirus*. B. *Pestivirus*. C. *Hepacivirus* y *Pegivirus* (Knipe, 2013).

Así como las proteínas tienen funciones similares para la replicación y funcionamiento del virión, también comparten funciones para evadir a la respuesta inmune.

En los *Flavivirus*, la proteína E es el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes y es la proteína más antigénica (Knipe, 2013). En los *Hepacivirus* las proteínas E1 y E2 son antígenos humorales importantes que al unirse a los anticuerpos pueden neutralizar al virus. Las proteínas E2 y NS5A pueden evadir la

respuesta inmune dependiente de interferón, esto lo hacen bloqueando la proteína kinasa R (PKR) que es sintetizada durante este tipo de respuesta inmune. Esta proteína inhibe la síntesis viral, y las proteínas E2 y NS5A son capaces de unirse a la PKR para evitar que realice su función. La proteína E2 también inhibe a las células NK y la proteína de la cápside puede inhibir al complemento (Porto-Espinoza *et al.*, 2006). En los *Pegivirus* la proteína E2 tiene una alta inmunogenicidad e interactúa con otros virus en co-infecciones y con proteínas del huésped para participar en la activación de la respuesta inmune. Tiene la capacidad de alterar las vías de señalización para la liberación de interleucinas y células NK (Yu *et al.*, 2022) al igual que los *Hepacivirus*.

Lo mismo sucede en la proteína E2 de los *Pestivirus*, pero este virus tiene las proteínas Erns y Npro no encontradas en los demás géneros. La proteína Npro tiene la capacidad de inhibir la producción de interferón. Las proteínas E2 y Erns son las más antigénicas (Knipe, 2013). Se ha reportado que estas dos proteínas bloquean la síntesis de interferón inducida por RNA viral. La proteína Erns tiene la función de degradar la cadena sencilla del RNA viral para prevenir la respuesta inmune de la célula infectada (Lussi *et al.*, 2021). La proteína Npro interviene en la secreción de interferón bloqueando el factor regulador de interferón 3 (IRF3) permitiendo así la replicación viral (Mou *et al.*, 2020) e interactúa con HAX-1 para inhibir la apoptosis (Peterhans *et al.*, 2013).

Así como los *Pestivirus* tienen dos proteínas no encontradas en los demás géneros, los *Flavivirus* también tienen dos proteínas que ningún otro género presenta; la proteína M y la NS1. La proteína NS1 es antigénica y tiene la capacidad de inhibir al complemento, evadiendo así la respuesta inmune (Avirutnan *et al.*, 2011) además de interferir con los receptores TLR que identifican el RNA viral (Chen *et al.*, 2017).

Otras proteínas con la capacidad de evadir a la respuesta inmune son NS2, NS3 y NS5A. En los *Flavivirus* la NS2A al igual que NS5 inhiben la señalización de interferón (Knipe, 2013). En los *Hepacivirus* se ha demostrado que la proteína NS2

puede inhibir la apoptosis (Chen *et al.*, 2017). Se sabe que en los *Pestivirus* las proteínas NS2 y NS3 también cumplen una función de inhibición de interferón por medio de la proteína M. Las proteínas NS2A, NS4A y NS4B de la familia viral pueden ser antagonistas de la ruta de señalización para la liberación de interferón tipo 1 (Schweizer *et al.*, 2020). Los *Pegivirus* utilizan las mismas proteínas E2 y NS5A como evasión de la respuesta inmune con funciones similares. Adicional a esto, la proteasa NS3 de los *Pegivirus* y NS3/4A de los *Hepacivirus* puede interrumpir la identificación del RNA viral, degrada la proteína mitocondrial de señalización (MAVS) que participa en la vía de activación de interferón posterior al reconocimiento de RNA (Arroyave-Ospina *et al.*, 2018) (Brown *et al.*, 2016).

Las proteínas de la familia *Flaviviridae* tienen funciones similares en cuanto al ciclo de replicación viral como para la evasión a la respuesta inmune. Esto nos sugiere que las proteínas podrían ser parecidas en secuencia y estructura o tener un ancestro común que dé origen a proteínas de función similar.

Sabemos que estos virus tienen la capacidad de inhibir la respuesta inmune y que la respuesta inmune hacia estos virus comienza cuando los receptores NOD-like receptors (NLR) detectan el RNA viral para posteriormente iniciar la cascada de señalización que permite la activación de interferón (IFN- $\beta$ ). Adicional a esto, existen otros receptores que serán capaces de reconocer el RNA viral, los TOLL-like-receptor (TLR). La activación de IFN- $\beta$  va a inhibir la replicación viral (Tizard, 2013), a su vez el IFN activa la síntesis del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) que se traslocará al núcleo para activar la síntesis de pro interleucina 1 beta (proIL-1 $\beta$ ) mientras el IFN suprime la replicación viral. Los receptores TLR van a iniciar con la activación y ensamblaje del inflamasoma que provocará la activación de pro-caspasa 1 a caspasa-1 que activará proIL-1 $\beta$  que promueve la respuesta inmune (Farag *et al.*, 2020). En algunos casos la célula invadida por virus iniciará con un proceso de apoptosis prematura para prevenir la replicación viral (Tizard, 2013).

En el artículo de Morales-Aguilar y colaboradores (2020) se describe como la respuesta inmune hacia el BVDV cepa NADL promueve la secreción de IL-1 $\beta$ , lo que supone la activación del inflamasoma NLRP3. En este mismo artículo se utilizan inhibidores de caspasa-1 (ZVAD y YVAD) los resultados mostraron una disminución en el título viral cuando las células fueron pre incubadas con los inhibidores, lo que podría sugerir diversas explicaciones:

1. La interacción de caspasa-1 con las proteínas virales.
2. La interacción de los inhibidores de caspasa-1 con las proteínas virales.

Las caspasas son proteínas que funcionan como proteasas y son parte importante en la vía de señalización para la ejecución de la apoptosis. Las caspasas se encuentran de forma inactiva en la célula y deben activarse, ya sea mediante autoproteólisis (caspasas iniciadoras) o por el corte de las caspasas iniciadoras (caspasas ejecutoras). La caspasa-1 es una caspasa iniciadora (Elinos-Báez *et al.*, 2001) que tiene la capacidad de escindir otras caspasas y proteínas mediante los aminoácidos de corte cisteína e histidina que podrán escindir aminoácidos como triptófano y tirosina (Denault *et al.*, 2001).

Diferentes caspasas tienen la capacidad de cortar virus. La caspasa-3 tiene la capacidad de escindir algunas proteínas de las familias virales *Reoviridae*, *Coronaviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Retroviridae*, *Parvoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Papillomaviridae*, *Adenoviridae*, *Astroviridae* y de la familia *Flaviviridae*, especialmente en los virus de Dengue (DENV), fiebre amarilla (YFV) y Zika (ZIKV) (Connolly *et al.*, 2017). Se han reportado escisiones por parte de caspasa-1 en virus de la familia *Baculoviridae* y otras caspasas como la caspasa 6, 7, 8, 9 y 10 son capaces de escindir virus como el virus Aletuano de la enfermedad del mink, el virus del papiloma humano, el astrovirus humano y el coronavirus humano (Richard *et al.*, 2012).

Sabemos que cada género tiene diferentes proteínas que ayudan a la evasión del sistema inmune pero no sabemos si en todos los virus existe la posibilidad de que

tengan mecanismos compartidos de evasión. Esto debido a la falta de estudios enfocados en algunos géneros de la familia viral, si las proteínas son evolutivamente similares, en los aminoácidos presentes y en su estructura, podrían tener las mismas funciones descritas para otros géneros además de que podrían tener, como función extra aún no descrita, la capacidad de interactuar con caspasa-1 en beneficio de la replicación viral. Es por esto que es importante realizar un estudio *In silico* en el que se comparan las secuencias y estructuras proteicas así como un análisis que nos permita predecir si existen sitios de corte para la caspasa-1 para posteriormente realizar pruebas *in-vitro* o *in-vivo* para que BVDV sirva como modelo para otras enfermedades de interés humano y animal.

## HIPÓTESIS

Las proteínas codificadas en la poliproteína del virus de diarrea viral bovina son filogenética y estructuralmente conservadas en la familia viral *Flaviviridae* y la caspasa-1 es capaz de interactuar con éstas para escindirlas.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar las similitudes evolutivas y estructurales de las proteínas codificadas en la poliproteína del virus de diarrea viral bovina y otros miembros de la familia *Flaviviridae* mediante análisis filogenéticos y estructurales para inferir los sitios de corte de caspasa-1 con éstas.

### Objetivos específicos

1. Realizar inferencias evolutivas de cada una de las proteínas virales mediante la construcción de árboles filogenéticos utilizando RaxML y FigTree para observar cambios evolutivos.
2. Modelar las proteínas virales mediante el uso de los programas Swiss Model y Chimera para observar similitudes estructurales de BVDV con las proteínas de los miembros de la familia *Flaviviridae*.
3. Hacer una predicción del sitio de corte de caspasa-1 hacia las proteínas virales con el uso de ExPASy Protein Cutter para observar una posible interacción entre la caspasa-1 con las proteínas virales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Árboles filogenéticos

Para la construcción de los árboles filogenéticos se realizaron alineamientos de secuencias con un protein Basic Local Alingment Search Tool (BLASTp) (Altschul *et al.*, 1990). En el que se comparó BVDV-1a cepa NADL contra las secuencias de las diferentes proteínas de los virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae* encontrados en el banco de secuencias del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (38 virus y 144,948 secuencias) (Protein, 2004), números de acceso de las secuencias encontrados en la sección “Anexo metodología”. Una vez obtenidas las secuencias con similitud se retiraron las secuencias incompletas o repetidas para poder hacer el alineamiento de las secuencias similares mediante MAFFT, programa utilizado para crear alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos (Rozewicki *et al.*, 2019) y visualizando los alineamientos en JalView, pograma para editar, visualizar y analizar alineamientos (Waterhouse *et al.*, 2009).

Utilizando los alineamientos de MAFFT, se acondicionó la plataforma BioConda para instalar paquetes de programas relacionados a la investigación biomédica con un ambiente Python (Grüning *et al.*, 2018) para generar una lista con los nombres de las secuencias alineadas y proceder a la construcción del árbol. En este alineamiento se obtuvieron los porcentajes de identidad con la secuencia de interés (BVDV-1a), exceptuando los virus con un alineamiento menor a 5 aminoácidos en el que no se realizó el calculo de porcentaje de identidad. Los árboles filogenéticos se construyeron con RaxML, este programa crea árboles filogenéticos con un modelo evolutivo de Maximum Likelihood. Los árboles filogenéticos se hicieron con 10,000 bootstraps para cada árbol y visualizamos el bipartition tree con el programa FigTree, visualizador de árboles filogenéticos (Rambaut, 2010). Los valores en los nodos de los árboles determinan la probabilidad de ocurrencia de una diferenciación evolutiva, este es calculado por RaxML (Stamatakis, 2018). Para establecer la raíz de los árboles, se utilizaron como outgroup las secuencias de virus de la familia *Flaviviridae* taxonomicamente más lejanas a los virus que conforman cada árbol

(género o especie diferente al de la mayoría). En caso de no existir algún virus con esas características se añadió al alineamiento un virus perteneciente a la familia pero taxonómicamente lejano a los virus que conforman el árbol, esto se especifica en cada árbol.

## Modelos proteicos

Las proteínas utilizadas para la realización de los modelos se obtuvieron de las secuencias alineadas y presentes en los árboles filogenéticos. Cada una de estas secuencias fue sometida al programa SwissModel de Expasy donde se realizaron modelos proteicos por homología desde proteínas cristalizadas dentro del banco de SwissModel (Waterhouse *et al.*, 2018) ver templado en la sección “Anexo Metodología”. Se seleccionaron los modelos con mayor identidad de secuencia para garantizar que el modelo utilizado fuera el más parecido en secuencia y el de menor QMEANDisCo, este nos indica que los átomos del modelo construido por homología y la proteína cristalizada que se conoce son cercanos lo que indica que se está utilizando el modelo más preciso. La visualización y análisis de estas proteínas se realizó en el programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

En Chimera, se prepararon los modelos para su análisis y se realizaron las comparaciones estructurales con MatchMaker para comparar dos secuencias y obtener la desviación cuadrática media (RMSD) que se obtuvo con un punto de corte de iteración de 2Å entre los pares de átomos de las proteínas comparadas para medir la distancia entre los átomos de proteínas superpuestas y así comparar la similitud de ambas. El porcentaje de identidad se obtuvo mediante el análisis del BLASTp y se comparó con el resultado de Chimera para comprobar la veracidad de este cálculo. Esto se realizó para determinar la similitud de los modelos. El análisis de los dominios fue realizado obteniendo los dominios de NCBI y haciendo las comparaciones al igual que para las proteínas completas.

## Predicción de escisiones por caspasa-1

Para la predicción de escisión por caspasa-1 se utilizó el programa Expasy en su variante Peptide Cutter por SwissModel. Este predice el corte de caspasa-1, la cuál mediante su triada catalítica consta de los residuos de aminoácidos: cisteína, histidina y ácido aspártico siendo las secuencias blanco las que sigan, generalmente, un patrón de 4 posiciones en dirección N terminal:

- Posición 4: Fenilalanina (F), triptófano (W), tirosina (Y) o leucina (L)
- Posición 3: Cualquier aminoácido
- Posición 2: Histidina (H), alanina (A) o treonina (T)
- Posición 1: Ácido aspártico (D) (Gasteiger *et al.*, 2005)

Las secuencias de las diferentes proteínas virales que componen la poliproteína de la familia *Flaviviridae* que tuvieron similitud en el BLASTp fueron sometidas a este programa, se realizó el análisis para un total de 89 secuencias.

Para ver con mayor detalle la metodología, ir a “Anexo metodología”.

## RESULTADOS

Se realizaron distintos BLASTp para cada proteína contenida en la poliproteína del BVDV cepa NADL. Estas se compararon contra otras secuencias de las mismas proteínas de virus de la familia *Flaviviridae* y en algunos casos se comparó contra poliproteínas completas. Las proteínas del BVDV1a cepa NADL (BVDV-1), que tuvieron similitud con las diferentes proteínas de distintos virus de la familia *Flaviviridae* y el porcentaje de similitud se enlistan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Porcentajes de identidad las proteínas de BVDV-1 comparadas con las proteínas de los virus que componen la familia *Flaviviridae*.

Proteína de BVDV-1	Proteína alineada	Virus alineado	%Iden
Npro	Npro	Fiebre porcina clásica	70.83%
	Npro	Enfermedad de las fronteras	70.24%
	Capside	Dengue 4	16.13%
Capside	Capside	Fiebre porcina clásica	75.79%
	Capside	Enfermedad de las fronteras	73.47%
	Capside	Pestivirus ovino	72.58%
	Capside	Diarrea viral bovina 3	74.49%
Erns	-	-	-
E1	E1	Fiebre porcina clásica	77.44%
	E1	Enfermedad de las fronteras	75.38%
	E1	Diarrea viral bovina 3	74.36%
	E1	Diarrea viral bovina 2	79.49%
	E1	Diarrea viral bovina 1b	85.13%
	E1	Atypical porcine pestivirus	31.16%
	E1	Diarrea viral bovina 1 Ind S1226	80.51%
	E1	Tunisian sheep virus	76.92%
	E1	Diarrea viral bovina Braidwood	86.15%
	E1	Diarrea viral bovina Bega	88.21%
	E1	Diarrea viral bovina Trangie Y546	86.67%
E2	E2	Fiebre porcina clásica	62.02%
	E2	Enfermedad de las fronteras	59.63%
p7	p7	Fiebre porcina clásica	54.29%
	p7	Enfermedad de las fronteras	52.86%
	p7	Hepacivirus M	12.68%
	p7	Diarrea viral bovina 2	57.14%

Cuadro 3. Comparación de las proteínas de BVDV-1 comparadas con las proteínas de los virus que componen la familia *Flaviviridae* (continuación).

Proteína de BVDV-1	Proteína alineada	Virus alineado	%Iden
NS2-3	NS2-3	Fiebre porcina clásica	72.62%
	NS2-3	Enfermedad de las fronteras	73.82%
NS3	NS3	Fiebre porcina clásica	89.90%
	NS3	Border disease virus	x
	NS3	Zika	20%
	NS3	Dengue 1	21.13%
	NS3	Dengue 2	21.88%
	NS3, NS4A	Hepacivirus C	25.42%*
	NS3	Hepatitis GB virus B	25.50%
	NS3	Diarrea viral bovina 2	92.90%
	NS3	Diarrea viral bovina 2-New York '93	91.80%
	NS3	Diarrea viral bovina Rit 4350	97.70%
	NS3	Hepacivirus C 3	24.58%
	NS3	West Nile Virus	26.92%
	NS3	Japanese encephalitis virus	23.33%
	NS3	GB virus C	28.09%
	NS3	Kunjin virus	50%**
	NS3	Wenling shark virus	24.32%
	NS3	Equine pegivirus 1	24.12%
	NS3	Saint Louis encephalitis	21.77%
	NS2B, NS3	Culex flavivirus	22.73%*
	NS2B, NS3	Mercadeo virus	22.87%*
	NS2B, NS3	Hanko virus	21.52%*
	NS3	Quang Binh virus	21.40%
	NS3	Culex theileri flavivirus	22.53%
	NS3	Ochlerotatus caspius flavivirus	20.52%
	NS3	Mosquito flavivirus	20.96%
	NS2B, NS3	Tamana bat virus	20.44%*
	NS3	Culiseta flavivirus	23.10%
	NS2B, NS3	Fiebre amarilla	50%*,**
	NS3	Nakiwogo virus	23.12%
	NS3	Palm Creek virus	23.89%
	NS3	Mac Peak virus	23.30%
	NS3	La Tina virus	21.17%
NS2B, NS3	Long Pine Key virus	21.75%**	
NS3	Haslams Creek virus	22.54%	
NS3	Karumba virus	21.61%	
NS4A	NS4A	Fiebre porcina clásica	87.50%
	NS4A	Enfermedad de las fronteras	89.09%

Cuadro 3. Porcentajes de identidad de las proteínas de BVDV-1 comparadas con las proteínas de los virus que componen la familia *Flaviviridae* (continuación).

Proteína de BVDV-1	Proteína alineada	Virus alineado	%Iden
NS4B	NS4B	Fiebre porcina clásica	78.39%
	NS4B	Enfermedad de las fronteras	76.37%
	NS4B	Diarrea viral bovina 1-CP821	22.19%
	NS4A, NS4B, NS5A	Diarrea viral bovina 1-NCP821	93.93%*
NS5A	NS5A	Fiebre porcina clásica	57.75%
	NS5A	Enfermedad de las fronteras	59.15%
	NS4B, NS5A, NS5B	Hepatitis GB virus B	40%*,**
	NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B	Hepacivirus B	40%*,**
	NS4B, NS5A, NS5B	Hepacivirus I	12.50%*
	NS5A	Hepatitis C 1a	30%*,**
	NS5A	Hepacivirus C	100%*,**
NS5B	NS4A, NS4B, NS5A	Diarrea viral bovina 1-NCP821	98.83%*
	NS5B	Fiebre porcina clásica	70.69%
	NS5B	Enfermedad de las fronteras	70.93%

Cuadro 3. Porcentajes de identidad entre las proteínas de los virus de la familia *Flaviviridae* comparadas con el BVDV-1. La columna “Proteína de BVDV-1” es la proteína de interés. La columna “Proteína alineada” señala la proteína del virus de la familia *Flaviviridae* (columna “virus alineado”) que se alineó con la proteína de BVDV-1. “%Iden” es el porcentaje de identidad obtenido para los BLASTp.

\*Se alineó con más de una proteína y el porcentaje obtenido es del total de las secuencias.

\*\*El porcentaje de identidad es bajo y no es estadísticamente confiable.

En la siguiente sección se reportan los resultados obtenidos de la construcción de los árboles filogenéticos y los modelos proteicos, para poder observar las relaciones filogenéticas y las similitudes estructurales de cada una de las proteínas de la familia *Flaviviridae*, además de estudiarse las interacciones con caspasa-1 (Figs. 1 a 28) que se encuentran resumidas al final de esta sección (Cuadro 4).

En la Figura 2 se muestra el árbol filogenético de la proteína Npro, este es un árbol monofilético donde se puede observar que BVDV-1 es el grupo ancestral del virus de fiebre porcina clásica (CSFV) y del virus de enfermedad de las fronteras (BDV), estos dos últimos encontrándose filogenéticamente más cercanos entre si. Estos tres virus se encuentran separados del virus del dengue 4 (DENV-4) por un evento de divergencia. DENV-4 fue utilizado como outgroup ya que como se observa en el

Cuadro 3, tuvo similitud con Npro con un fragmento de la proteína C y NS1, en BVDV-1 que a su vez se encuentra separado del virus del Dengue 4 (DENV-4) que fue utilizado como outgroup.

Se observa el modelo proteico para la proteína Npro de BVDV-1 (Fig. 3). Se muestra el modelo proteico de Npro con la triada catalítica señalada en rojo (Figs. 3A y 3B). Posteriormente, se observan las comparaciones de BVDV-1 con CSFV (Fig. 3C), BDV (Fig. 3D) y DENV-4 (Fig. 3E). Al realizar el BLASTp, CSFV y BDV arrojaron porcentajes de identidad de 70.835% (Fig. 3C) y 70.24% (Fig. 3D), respectivamente. DENV-4 mostró 16.13% de identidad con Npro de BVDV-1 (Fig. 3E). Por otro lado, se calcularon los valores de RMSD al realizar las comparaciones estructurales de los modelos proteicos, obteniendo valores menores a 1Å, lo que nos indica que los átomos son muy cercanos entre ellos (Barnett *et al.*, 2022) excepto en DENV-4 que arrojó un valor superior a 3Å. En la Figura 4 se observa el BLASTp donde en rojo vemos el alineamiento de la triada catalítica de Npro de los aminoácidos glicina (G), histidina (H) y cisteína (C), esta se encuentra conservada en BVDV-1, CSFV y BDV y se mantiene en la misma ubicación en el modelo (Fig. 3) y en la secuencia (Fig. 4) a pesar de las altas tasas de mutación existentes en los virus. En el análisis para predecir una posible escisión de caspasa-1 hacia Npro no existe sitio de corte en la secuencia.

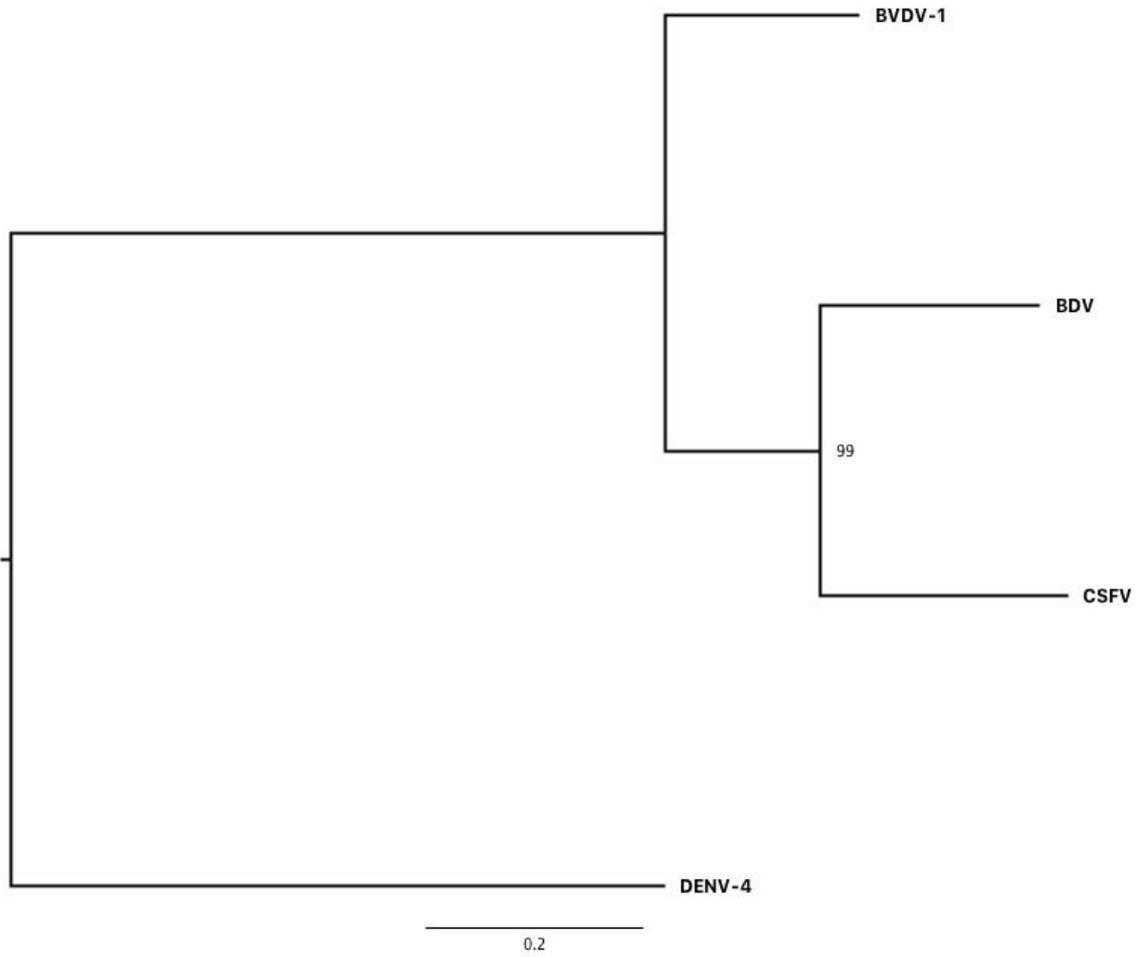


Figura 2. Árbol filogenético de la proteína Npro.

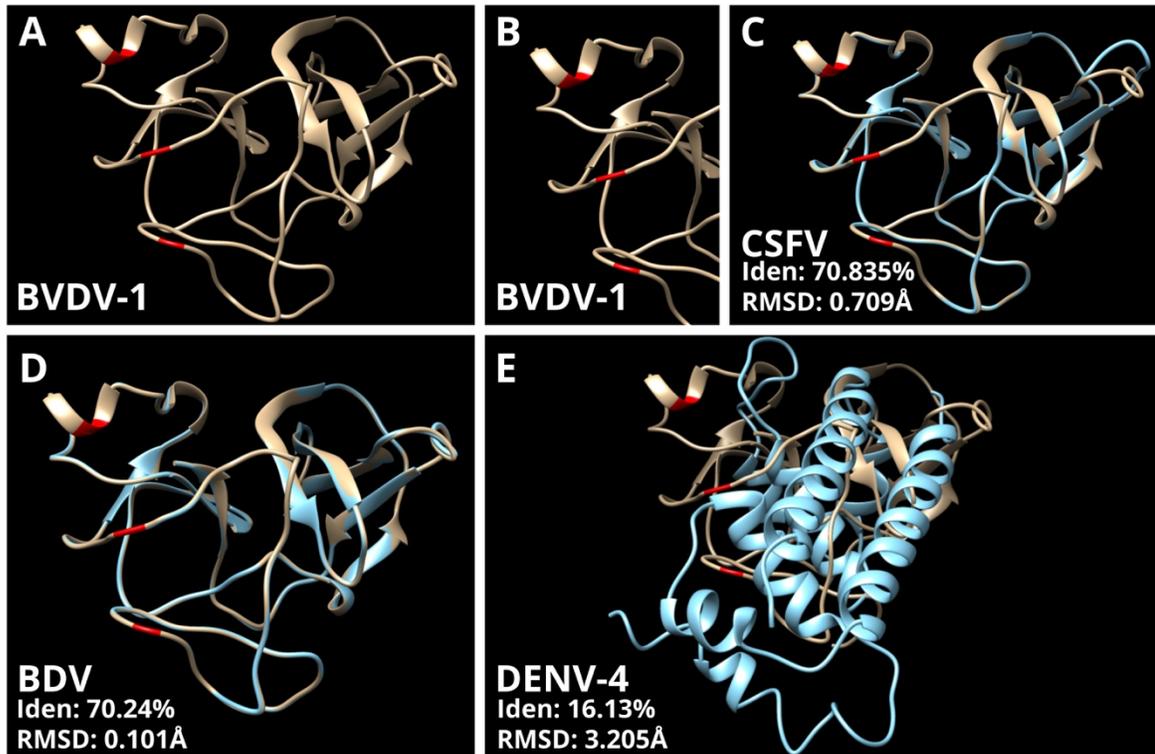


Figura 3. Modelos proteicos de la proteína Npro. A. Modelo proteico en listones de la proteína Npro de BVDV-1. B. Modelo proteico en listones de BVDV-1 con triada catalítica señalada en (rojo). C. Comparación estructural de los modelos proteicos de BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). D. BVDV-1 (dorado) y BDV (azul). E. BVDV-1 (dorado) y DENV-4 (azul). Iden: Identidad, RMSD: Root Mean Square Deviation.

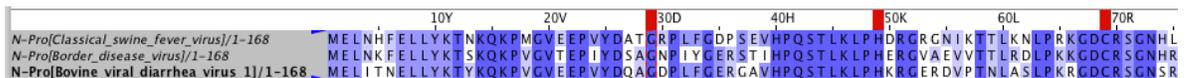


Figura 4. Alineamiento y triada catalítica de Npro (rojo).

En la Figura 5 se observa la construcción del árbol filogenético de la proteína de la cápside, presente en casi todos los virus de esta familia. Se aprecia una separación de dos clados, uno entre CSFV y el pestivirus ovino (*OvinePestivirus*) y un segundo clado con BVDV-1 y el virus de diarrea viral bovina tipo 3 (BVDV-3) manteniéndose filogenéticamente más cercanos BVDV-1 y BVDV-3 y al mismo tiempo CSFV y *OvinePestivirus* entre si. BDV se mantuvo lejos de estos por el evento de divergencia. En esta proteína no fue posible realizar los modelos proteicos debido a que los plantados existentes no tenían relación con los virus o la proteína y al realizar el análisis para determinar un sitio de corte en la proteína C por caspasa-1 no se obtuvo un posible corte sobre la secuencia de la misma.

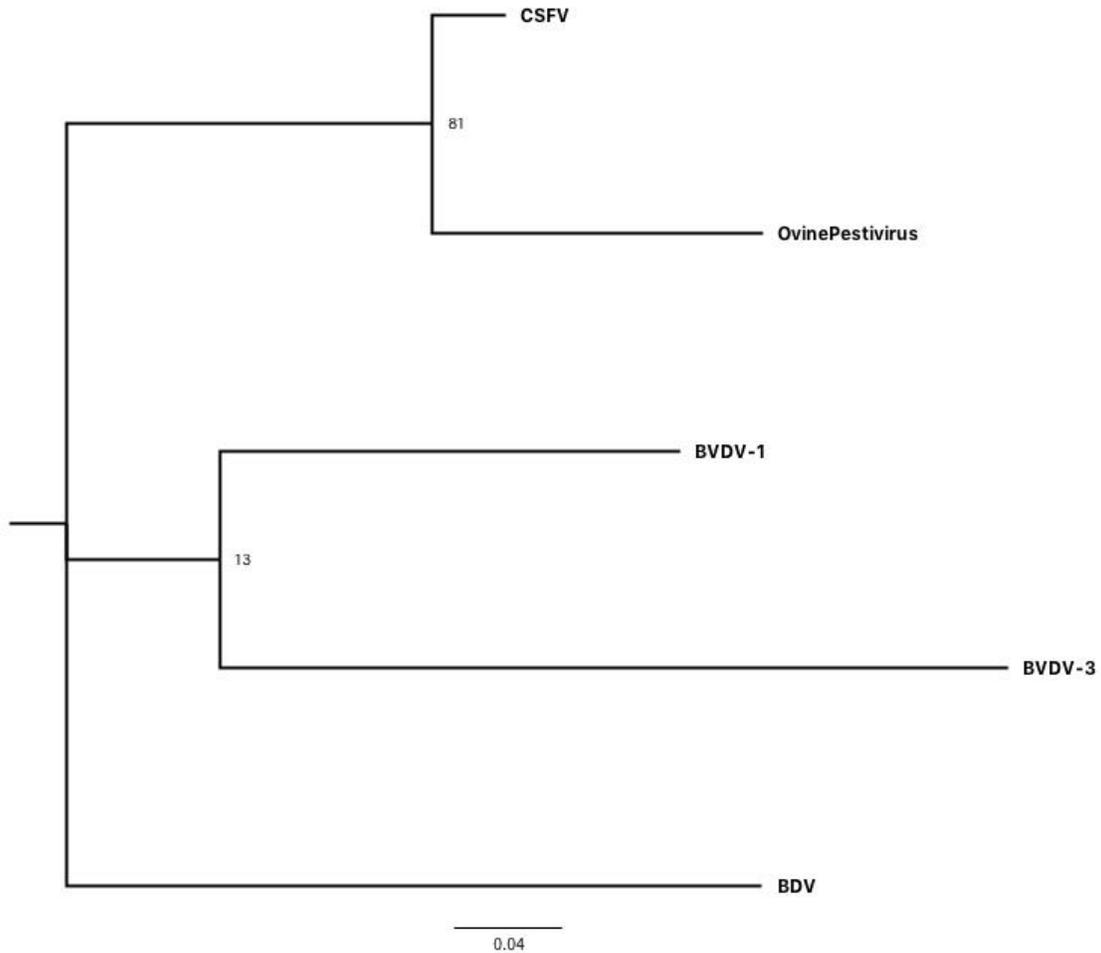


Figura 5. Árbol filogenético de la proteína C.

La proteína Erns solo se encuentra en los *Pestivirus* y al realizar el BLASTp no se obtuvo ninguna similitud, por lo que no se realizó la construcción del árbol filogenético aunque sí se realizó el modelo proteico. La representación de esta proteína se muestra en la Figura 6 y en la Figura 7 se señala en rojo el sitio en donde la proteína podría ser cortada por caspasa-1, este sitio corresponde al residuo de aminoácido ácido aspártico en la posición 48.



Figura 6. Modelo proteico en listones de la proteína Erns de BVDV-1.

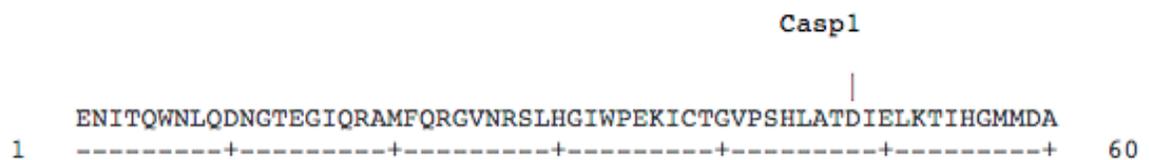


Figura 7. Corte de caspasa-1 a la proteína Erns. Modelo proteico en listones de la proteína Erns señalado en rojo y rodeado de un círculo verde el posible sitio de corte de caspasa-1. En la secuencia se muestra el posible punto de corte de caspasa-1.

En el árbol filogenético de la proteína E1 donde se evidencia un grupo monofilético pues todos estos virus provienen de un mismo ancestro en común (Fig. 8) siendo BDV el grupo más cercano. Se observan cercanos los virus de CSFV y el pestivirus de Tunisia cepa BM01 (TSV-BM01) y a su vez BVDV-3, el virus de diarrea viral bovina tipo 2 (BVDV-2) y BVDV-1 de diferentes cepas se encuentra filogenéticamente más cercanos, sin embargo, se observan diferentes mutaciones en el largo de la rama siendo separados de *Atypical porcine pestivirus* por evento de divergencia. En este árbol se observa al BDV lejano a los demás *Pestivirus* representados, teniendo un ancestro común más lejano que el existente entre el grupo monofilético. Los valores bajos de bootstrap se deben a la rápida acumulación de mutaciones y al limitado número de secuencias por cepa, en esta proteína no fue posible realizar los modelos proteicos debido a que los plantados existentes no tenían relación con los virus o la proteína y el análisis de caspasa-1 no arrojó una posible escisión.

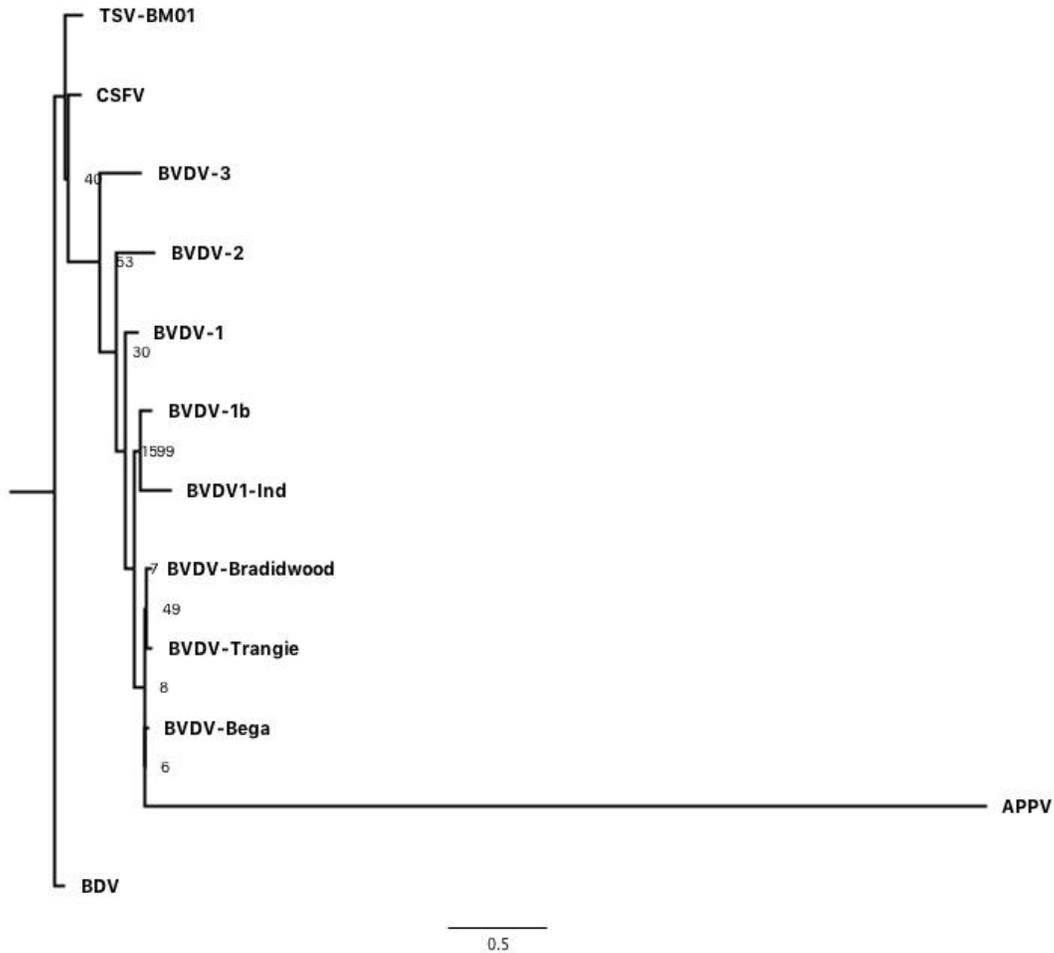


Figura 8. Árbol filogenético de la proteína E1.

En el árbol filogenético de la proteína E2 (Fig. 9) se observa que BVDV-1 y CSFV son parte de la misma rama teniendo un mismo ancestro común con BDV, que a su vez es el grupo ancestral de BVDV-1 y CSFV. DENV-3 fue utilizado como grupo externo pues es un miembro de la familia *Flaviviridae* que podía ayudarnos a enraizar el árbol. En el modelo proteico de E2 de BVDV-1 (Fig. 10 A), se observan las comparaciones estructurales de los modelos proteicos de la proteína E2 de CSFV y BDV (Figs. 10B y 10C, respectivamente), respectivamente, con la proteína de BVDV-1. Los porcentajes de identidad obtenidos en el BLASTp fueron de 62.03% para CSFV (Fig. 10B) y de 59.63% para BDV (Fig. 10C), también vemos que el RMSD de CSFV de 9.968Å y el de BDV de 0.449Å. Esos dos puntos de diferencia

podrían indicarnos la separación evolutiva en la estructura de la proteína. El estudio de caspasa-1 no arrojó posible punto de escisión con BVDV-1.

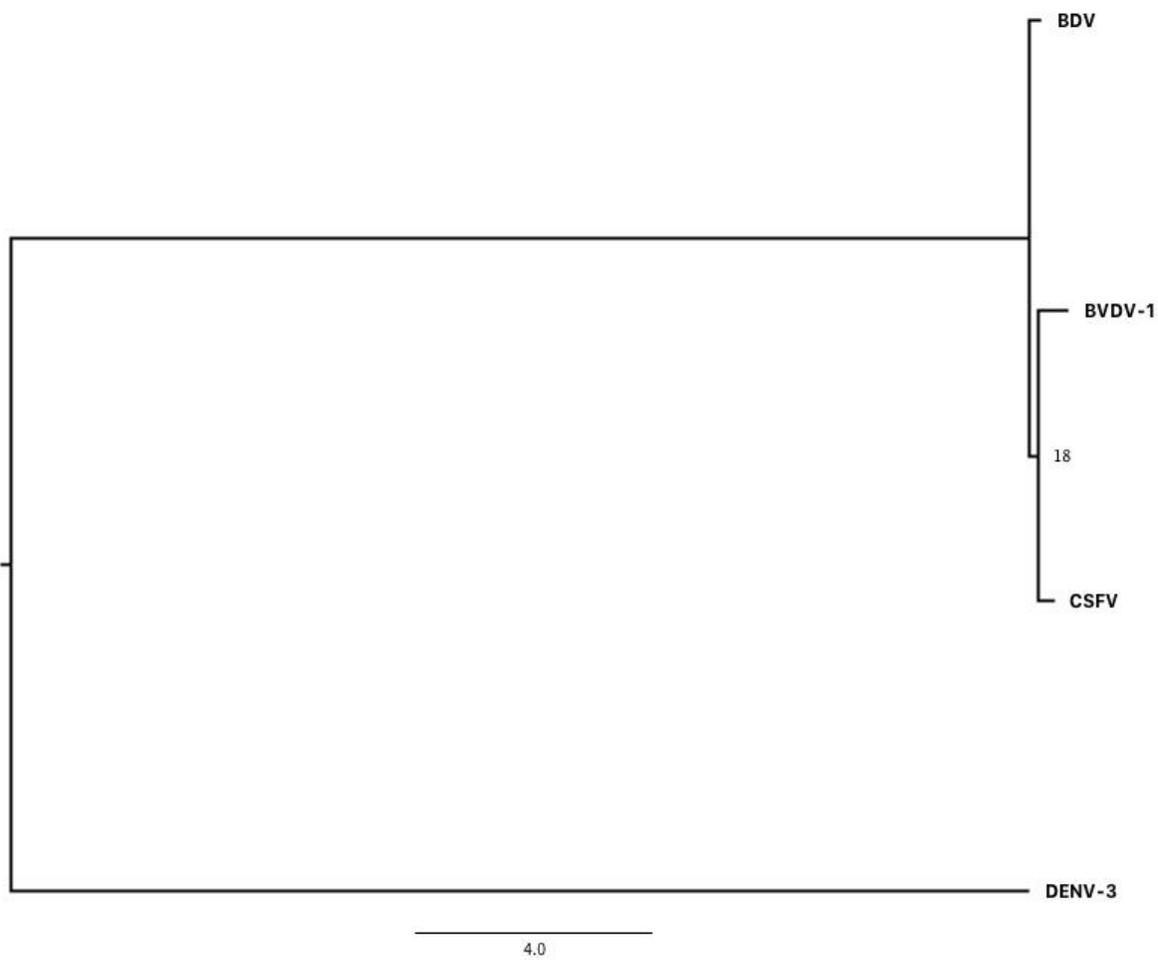


Figura 9. Árbol filogenético de la proteína E2.

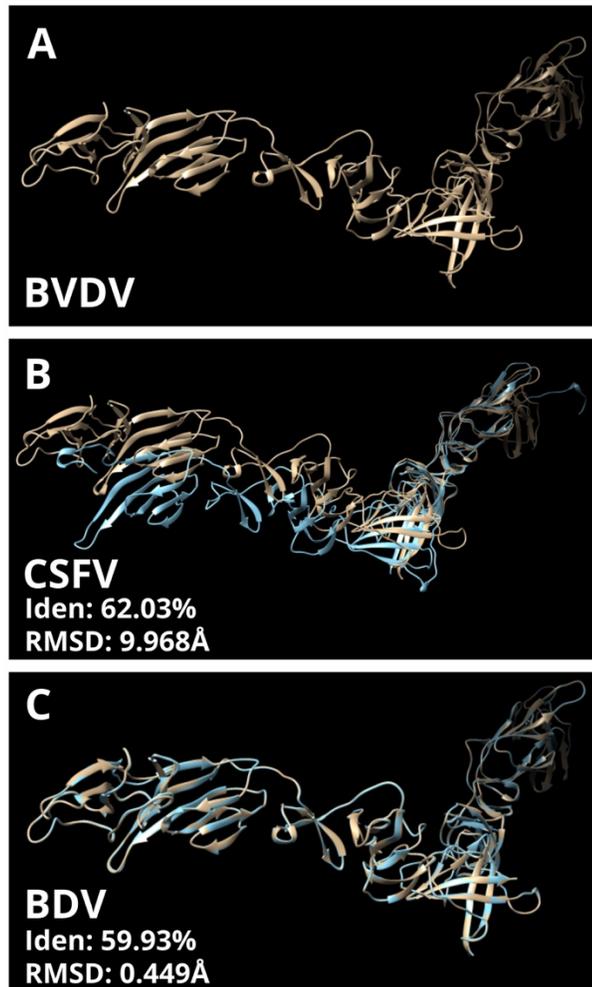


Figura 10. Modelos proteicos de la proteína E2. A. Modelo proteico en listones de BVDV. B. Comparación estructural de los modelos proteicos de BVDV (dorado) y CSFV (azul). C. BVDV (dorado) y BDV (azul).

En el resultado obtenido de la construcción del árbol filogenético para la proteína p7 (Fig. 11), se observa que esta proteína de BDV tuvo una divergencia con la proteína p7 de CFSV y BVDV-1 y estos mantuvieron la misma ruta donde posteriormente se diferenciaron con una probabilidad de soporte de rama bajo (12%). CSFV, BVDV-1 y BDV son un grupo monofilético que comparten una rama y un mismo ancestro común siendo separados por un evento de divergencia del *Hepacivirus M* (HCV-M). No fue posible realizar modelos proteicos para esta proteína debido a la falta de un templado relacionado con el virus o la proteína y el estudio de caspasa-1 no arrojó un posible punto de corte.

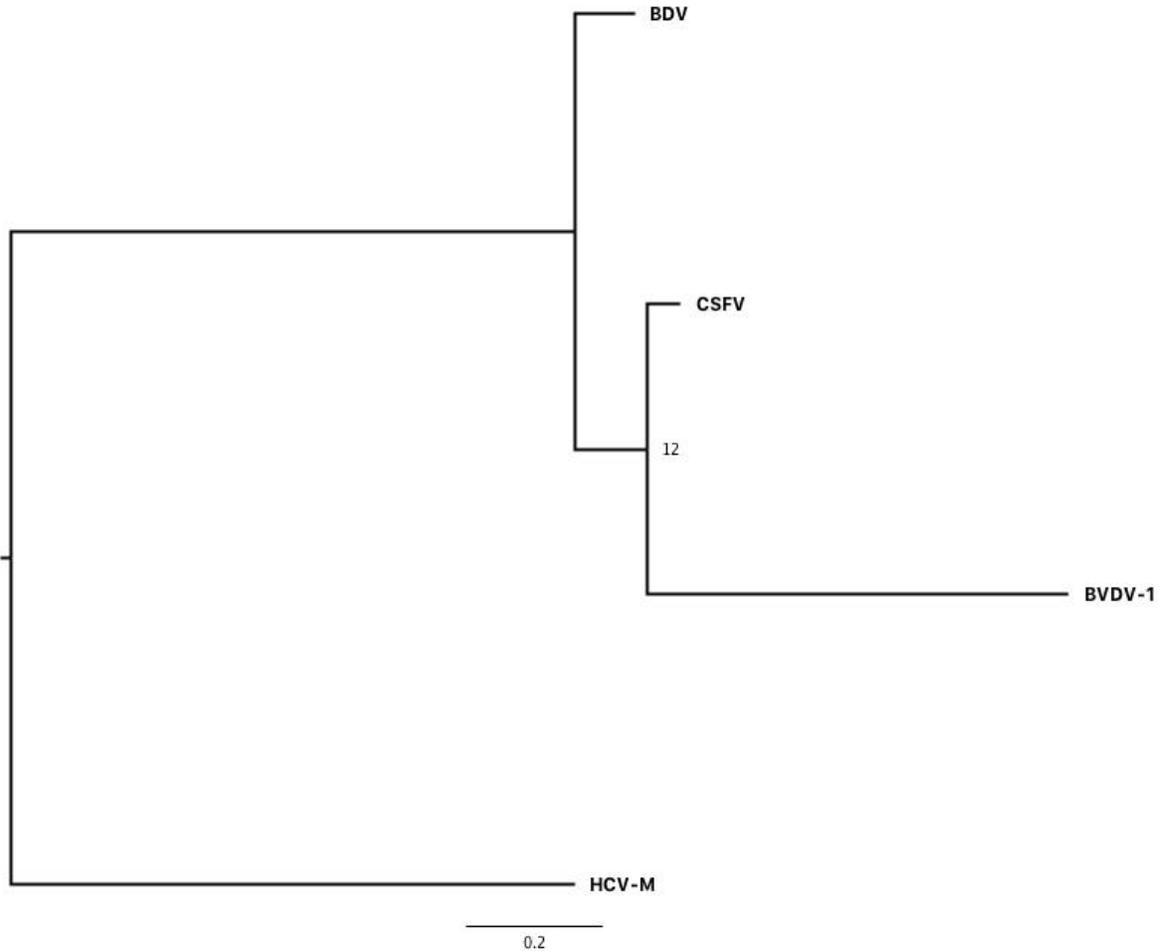


Figura 11. Árbol filogenético de la proteína p7.

Las proteínas NS2 y NS3 son importantes para la replicación del virus, siendo estas las responsables de la escisión de la poliproteína. En BVDV-1 no se encuentra escindida y dado que esta cepa es la que se utilizó en el estudio de Morales-Aguilar (2020), se utilizó para la construcción del árbol y para los modelos proteicos.

En el árbol filogenético de la Figura 12 se aprecia la cercanía de los *Pestivirus*: BDV, CSFV y BVDV-1, siendo CSFV y BVDV-1 filogenéticamente más cercanos. Al igual que en la proteína p7, hubo una separación en la evolución de la proteína en los virus CSFV y BVDV-1 con BDV. Con este antecedente, se construyeron modelos

proteicos para la proteína NS2-3 de BVDV-1, CSFV y BDV como se muestra en la Figura 13 y se observaron las similitudes estructurales entre estos virus para así analizar si el árbol obtenido se sostenía con un análisis directo en las proteínas. Al realizar el BLASTp de estas proteínas, se encontró una similitud de 72.62% al comparar CSFV y BVDV-1 (Fig. 13B) y 73.82% entre BDV y BVDV-1 (Fig. 13C) , además se observa un RMSD de 1.1Å en CSFV (Fig. 13B) y 1.152Å en BDV (Fig. 13C). Se realizó el análisis para encontrar puntos de corte por caspasa-1 en BVDV-1, se obtuvieron 2 puntos de escisión en los aminoácidos 74 y 157, correspondientes ambos a ácido aspártico (D) (Fig. 14).

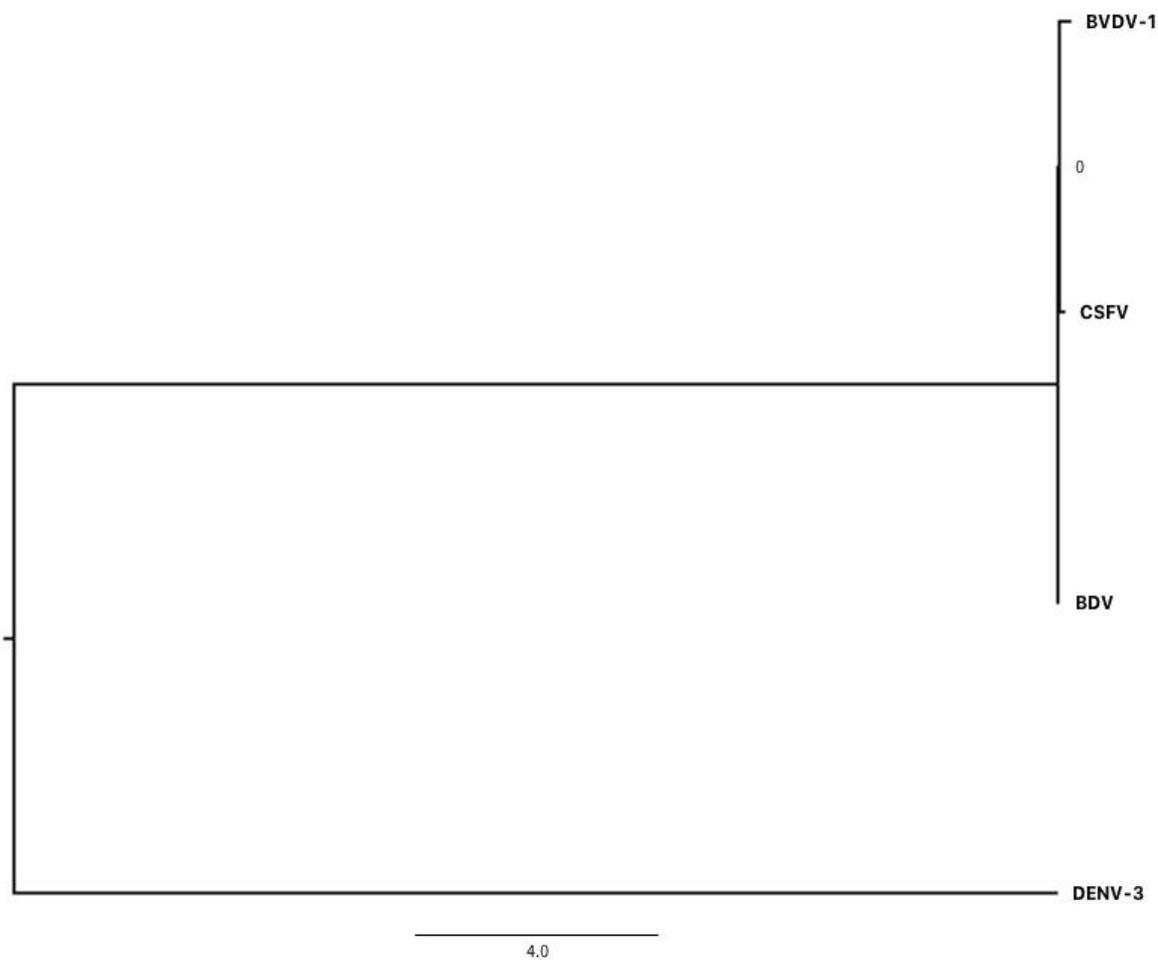


Figura 12. Árbol filogenético de la proteína NS2-3.

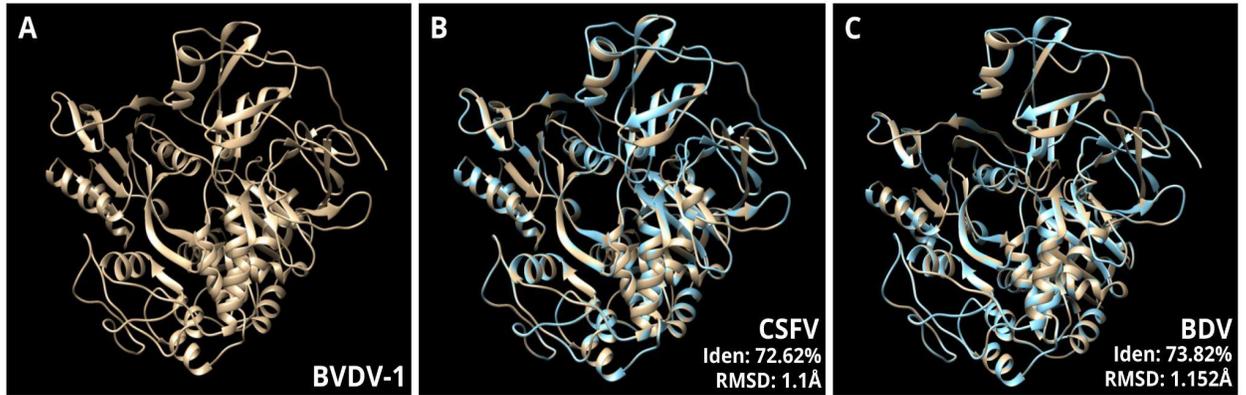


Figura 13. Modelos proteicos de la proteína NS2-3. A. Modelo proteico en listones de BVDV-1. B. Comparaciones estructurales de los modelos proteicos de BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). C. BVDV-1 (dorado) y BDV (azul).

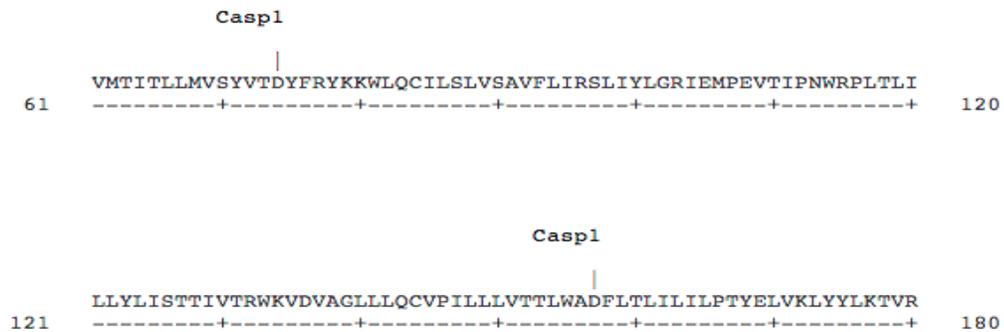
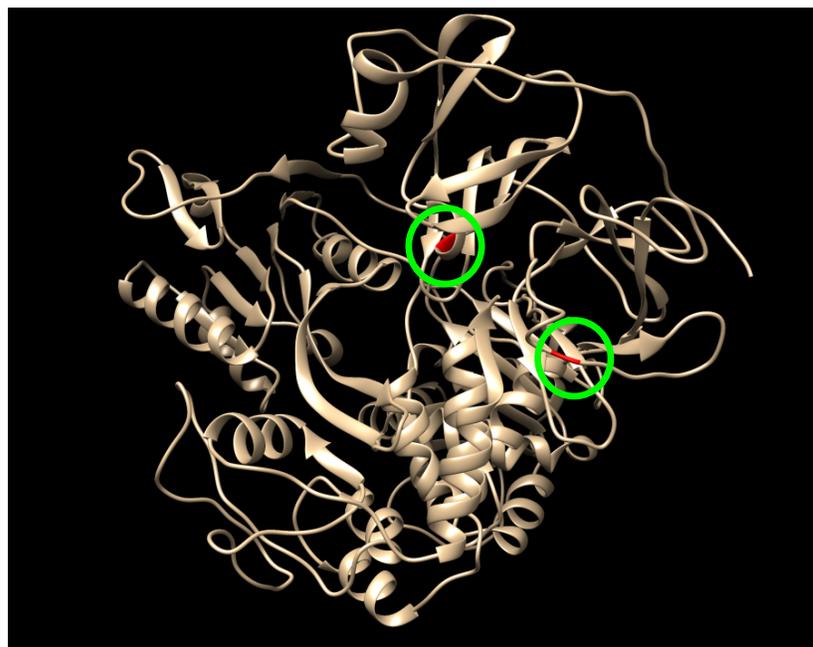


Figura 14. Corte de caspasa-1 a la proteína NS2-3. Modelo proteico en listones de la proteína NS2-3 señalado en rojo y rodeado de un círculo verde el posible sitio de corte de caspasa-1. En la secuencia se muestra el posible punto de corte de caspasa-1.

La proteína NS2-3 contiene 3 dominios diferentes, el dominio Jiv observado en la Figura 15 que se encuentra en la parte NS2 de la proteína y los dominios peptidasa y dead-like helicase que se encuentran en la proteína NS3. Se realizó el análisis de estos dominios para poder visualizar las similitudes en la parte funcional de la proteína.

El dominio Jiv de la proteína NS2-3 es la parte funcional de la proteína NS2 pues este es el responsable de la escisión entre NS2 y NS3 (Kameyama *et al.*, 2008). Se observaron porcentajes de identidad de 66.67% y valores de RMSD de 0.044Å para CSFV (Fig. 15B) y de 54.55% y de 0.036Å para BDV (Fig. 15C) al compararlos con el dominio Jiv de BVDV-1 (Fig. 15A), siendo los valores de RMSD menores a 1Å.

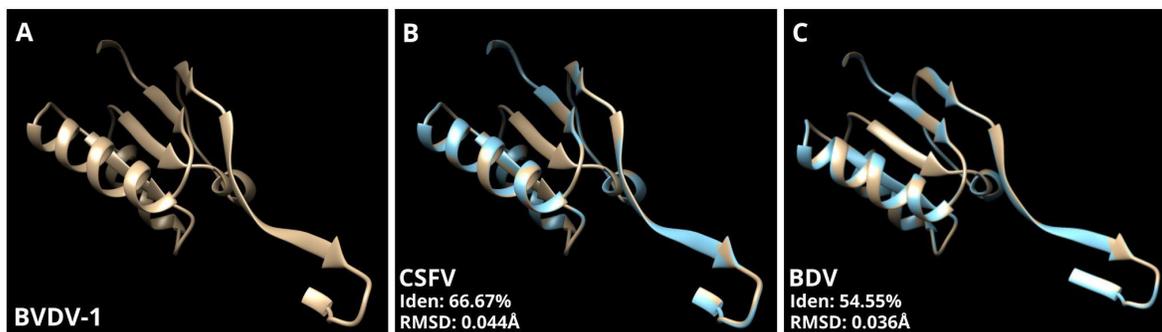


Figura 15. Modelos proteicos del dominio Jiv de la proteína NS2-3. A. Modelo proteico en listones del dominio Jiv de la proteína NS2-3 de BVDV-1. B. Comparaciones estructurales de los modelos proteicos del dominio Jiv de BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). C. BVDV-1 (dorado) y BDV (azul).

La proteína NS3 contiene los otros dos dominios de esta proteína. Antes de analizar los dominios, construimos el árbol filogenético de la proteína NS3 (Fig. 16).

La proteína NS3, es la más conservada en la familia *Flaviviridae*, el árbol filogenético nos muestra una historia evolutiva monofilética con 35 virus diferentes, teniendo virus de todos los géneros divididos en cuatro clados. Los clados I (morado) y II (verde) de *Flavivirus*, el clado III (naranja) de *Pestivirus* y el clado IV (azul) de *Hepacivirus* y *Pegivirus*. Entre los clados, se observa la divergencia entre el clado I y los clados II y III hay un 100% de probabilidad de la divergencia de los grupos y entre las ramas de esos clados hay probabilidades del 100%. En la diferenciación

del clado II con el clado III existe un 93% de probabilidad de que así ocurriera el suceso evolutivo y también se observa que estos dos clados son filogenéticamente más cercanos entre si que con los clados I y IV. Dentro del clado III hay dos ramificaciones principales donde se separa el virus de TABV de varios pestivirus, estos *Pestivirus* tienen probabilidades mayores al 70% lo que hace factible que estos virus hayan seguido este camino para llegar a lo que conocemos hoy.

En los modelos proteicos de algunos virus representantes de cada clado (Fig. 17), se compararon únicamente los modelos de los virus de mayor interés veterinario y humano, sin discriminar si el porcentaje de identidad era alto o bajo. En su mayoría, estos porcentajes fueron menores al 30% y solamente CSFV tuvo un porcentaje de identidad superior al 80%. Observamos también que el RMSD de CSFV en su comparación con BVDV-1 es de 1.1Å (Fig. 17C) y el de BDV es de 1.152Å (Fig. 17D), esto hace evidente la pertenencia de estos tres virus al mismo clado (naranja). El virus del Zika (ZIKV) tiene un RMSD de 34.821Å (Fig. 17E), el virus del Dengue tipo 1 (DENV-1) con 10.987Å y el virus del Dengue tipo 2 (DENV-2) con 29.239Å (Fig. 17F y 17G) y pertenecen al mismo clado (morado). El *Hepacivirus C* (HCV) y el *Pegivirus humano* (GBV-B) con 8.623Å y 9.418Å respectivamente (Figs. 17H y 17I) agrupados en el clado marcado con el color azul. En el análisis de caspasa-1 no se observaron posibles cortes en la proteína NS3 de BVDV-1.

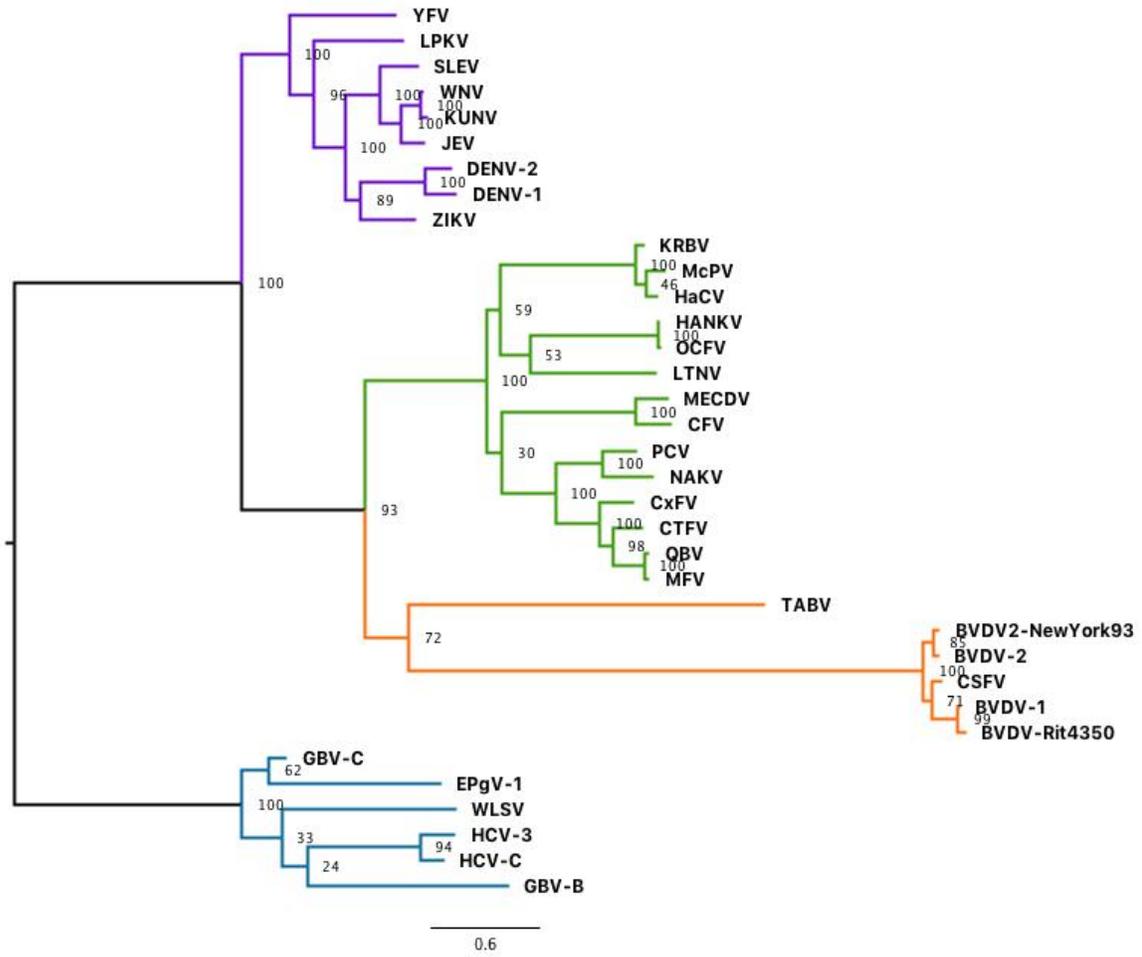


Figura 16. Árbol filogenético de la proteína NS3.

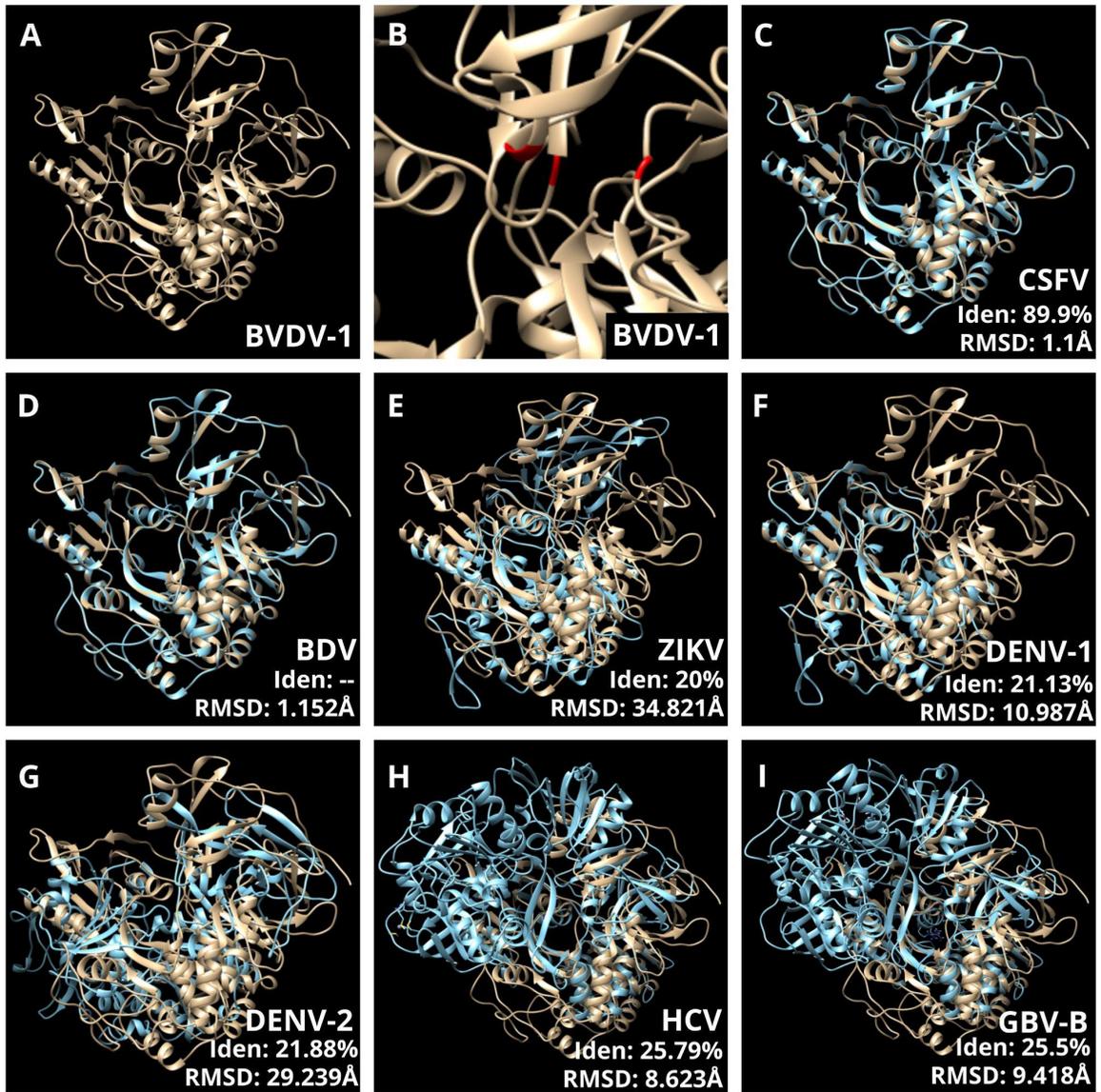


Figura 17. Modelos proteicos de la proteína NS3. A. Modelo proteico en listones de BVDV-1. B. Modelo proteico en listones de BVDV-1 con triada catalítica señalada en (rojo). Comparaciones estructurales de los modelos proteicos de C. BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). D. BVDV-1 (dorado) y BDV (azul). E. BVDV-1 (dorado) y ZIKV (azul). F. BVDV-1 (dorado) y DENV-1 (azul). G. BVDV-1 (dorado) y DENV-2 (azul). H. BVDV-1 (dorado) y HCV (azul). I. BVDV-1 (dorado) y GBV-B (azul).

Las comparaciones del dominio peptidasa de NS3 se observan en la Figura 18. En el modelo de este dominio de BVDV-1, se señala en rojo la triada catalítica (Fig. 18A). En la comparación de BVDV-1 con CSFV se obtuvo un porcentaje de identidad del 89.57% y un RMSD de 0.383Å (Fig. 18B) y en la comparación de BVDV-1 con BDV de 89.47% y un RMSD de 0.386Å (Fig. 18C). Se comparó este

dominio con otros virus de interés en la salud pública como el ZIKV, DENV-1, DENV-2, HCV y GBV-B (Figs. 18D a 18H) donde no se observaron valores de RMSD o estos son superiores a 3Å lo que indica que no hay homología estructural. Al realizar los alineamientos de proteínas, observamos que hay mucha variación a nivel secuencia entre las cepas de virus, donde se observan cambios de residuos de aminoácidos y deleciones. Sin embargo, la triada catalítica presente en este dominio es conservada en todos los virus que tuvieron similitud en el BLASTp de la familia en los que la secuencia se encuentra completa. En la Figura 19 se señala en rojo la triada, correspondiente a los aminoácidos histidina (H), ácido aspártico (D) y glicina (G), esta triada se encuentra conservada en todos los virus con excepción de las secuencias incompletas.

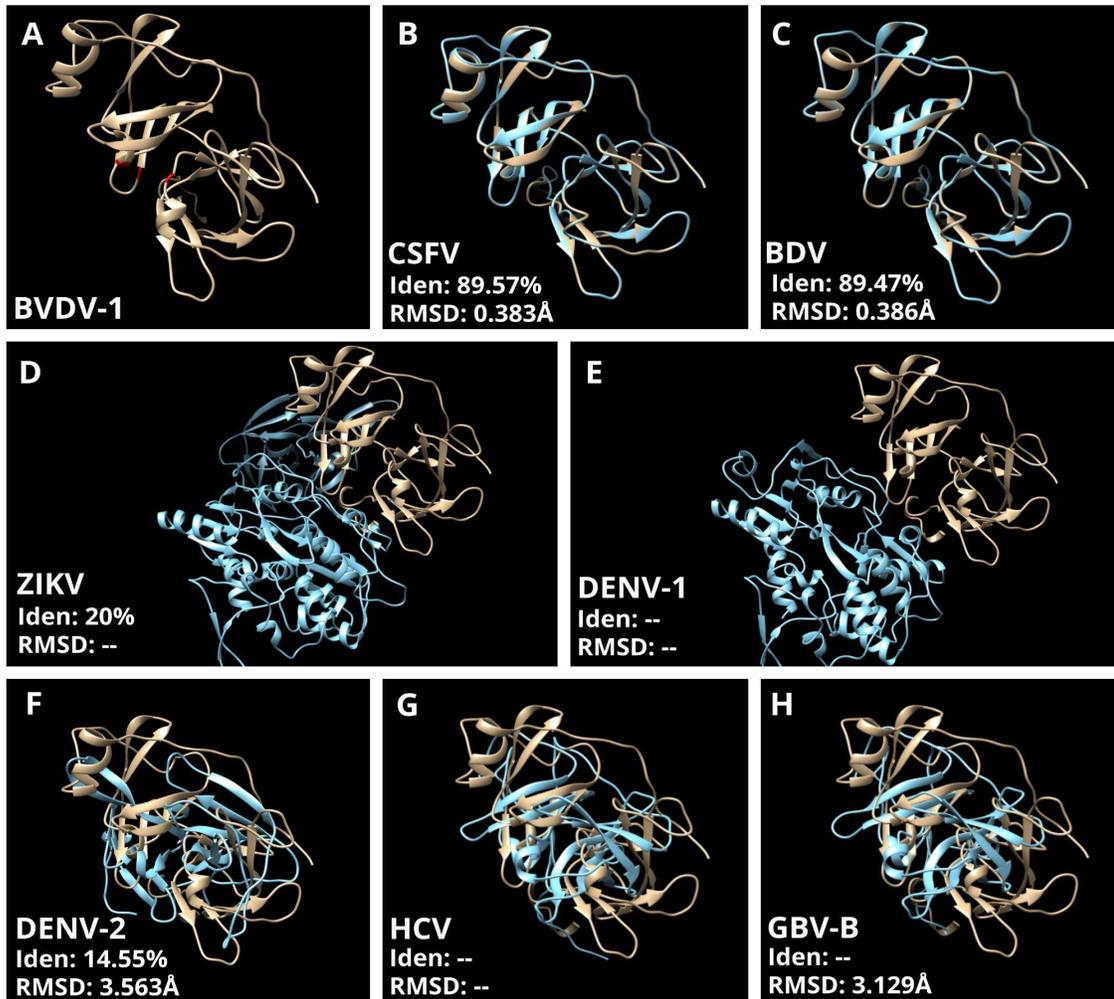


Figura 18. Comparaciones de los modelos proteicos del dominio peptidasa de NS3. A. Modelo proteico en listones del dominio peptidasa de la proteína NS3 de BVDV-1. B. BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). C. BVDV-1 (dorado) y BDV (azul). D. BVDV-1 (dorado) y ZIKV (azul). E. BVDV-1 (dorado) y DENV-1 (azul). F. BVDV-1 (dorado) y DENV-2 (azul). G. BVDV-1 (dorado) y HCV (azul). H. BVDV-1 (dorado) y GBV-B (azul).

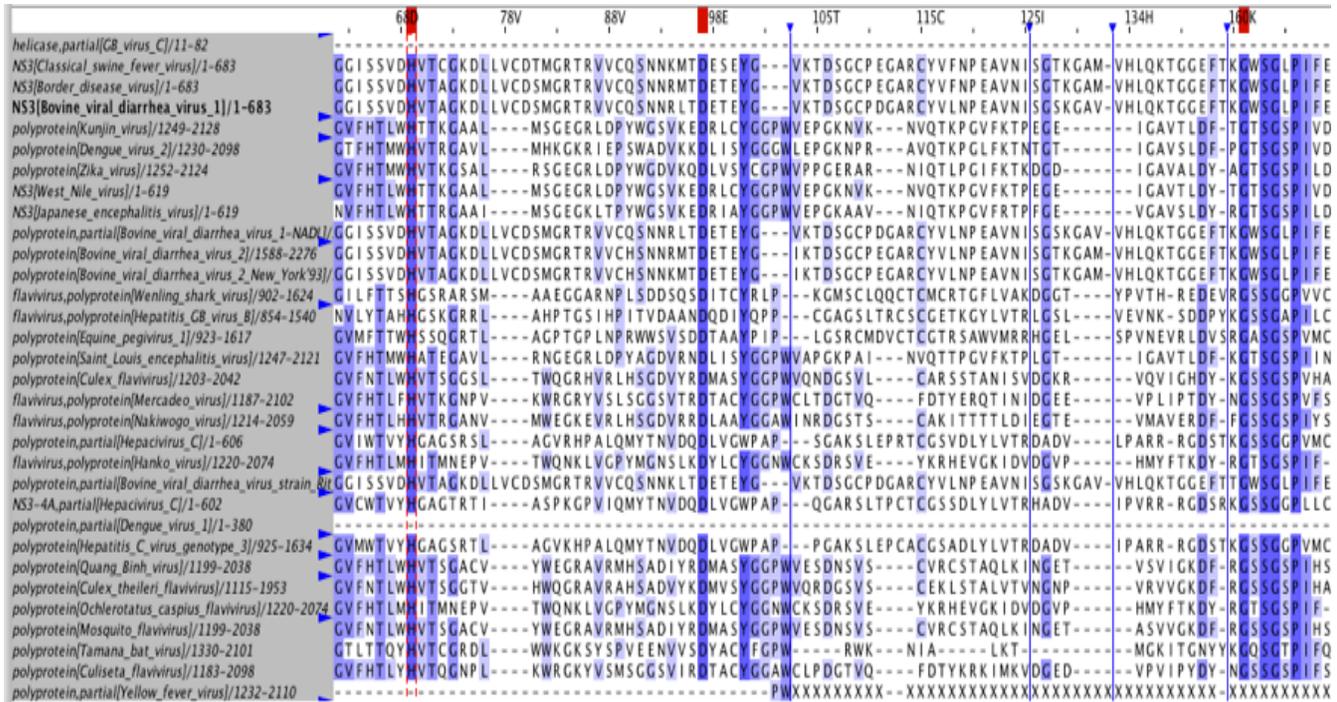


Figura 19. Alineamiento y triada catalítica de NS3 observada en rojo.

La Figura 20 nos muestra la construcción del dominio Dead-like helicase, se aprecian porcentajes de identidad menores al 35% y RMSD superiores a 1Å para la mayoría de los virus analizados, con excepción de CSFV (Fig. 20B) y BDV (Fig. 20C), los cuales fueron de 90.94% y 0.315Å y 90.28% y 0.324Å, respectivamente. Sin embargo, se observa un acoplamiento de este dominio con BVDV-1 para ZIKV, DENV-1, DENV-2, HCV-C y GBV-B (Figs. 20D a 20H) el RMSD es mayor a 1Å.

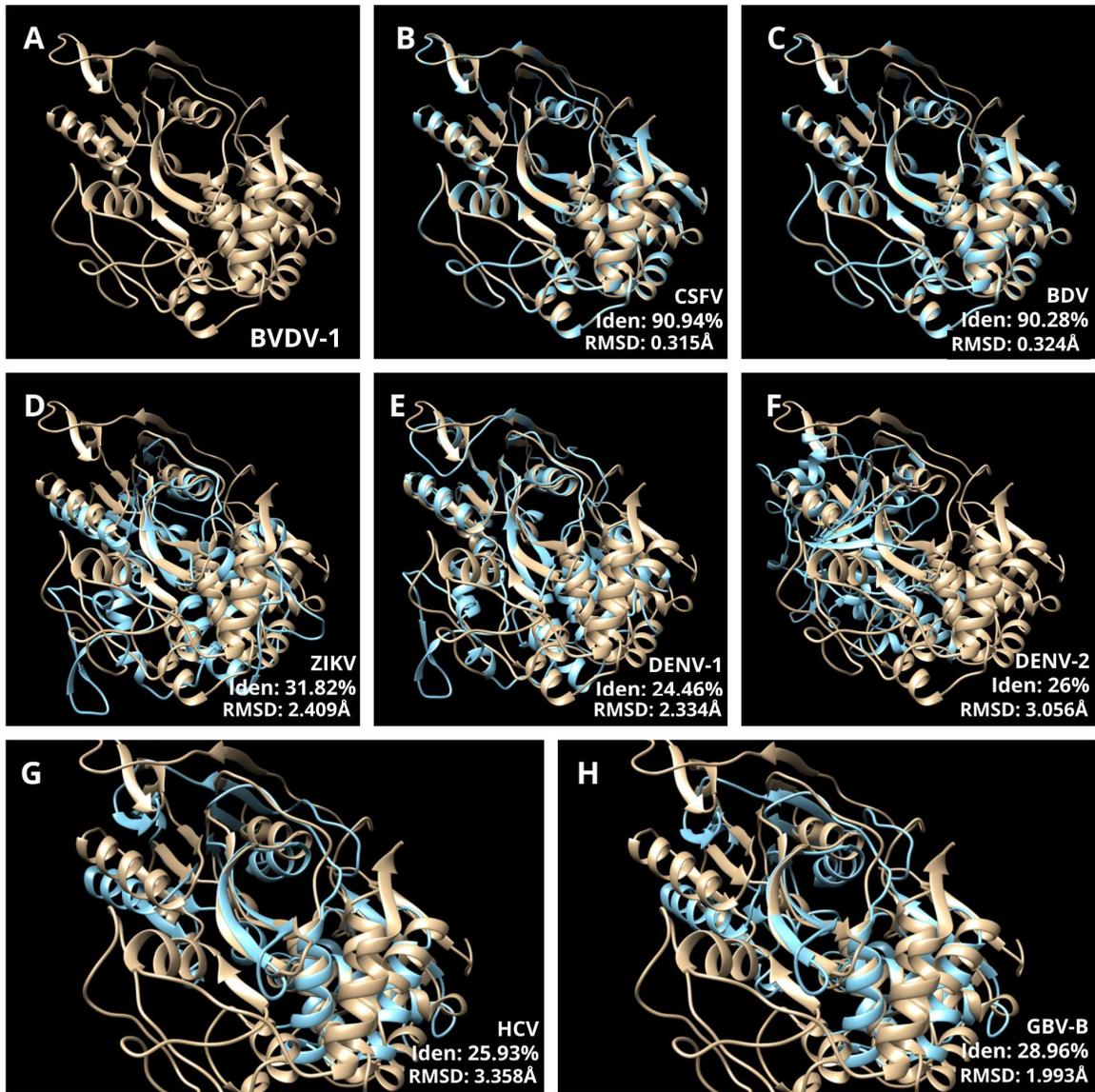


Figura 20. Modelos proteicos del dominio Dead-like helicase de NS3. A. Modelo proteico en listones del dominio dead-like helicase de NS3 de BVDV-1. B. Comparaciones estructurales de los modelos proteicos del dominio dead-like helicase de BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). C. BVDV-1 (dorado) y BDV (azul). D. BVDV-1 (dorado) y ZIKV (azul). E. BVDV-1 (dorado) y DENV-1 (azul). F. BVDV-1 (dorado) y DENV-2 (azul). G. BVDV-1 (dorado) y HCV (azul). H. BVDV-1 (dorado) y GBV-B (azul).

Se analizaron las proteínas NS4A y NS4B pues están presentes en todos los géneros de la familia viral. En el árbol filogenético de la proteína NS4A (Fig. 21) se muestra la relación evolutiva entre los pestivirus, teniendo una probabilidad en la ramificación de CSFV y BDV del 100%; estos se encuentran separados de BVDV-1. En los modelos proteicos para NS4A (Fig. 22) donde se observan porcentajes de

identidad de 87.50% y RMSD de 0.039Å para CSFV (Fig. 22B) y 89.06% y 0.105Å para BDV (Fig. 22C), lo que nos indica que en su ramificación CSFV se conservó estructuralmente más que BDV, pero no en su secuencia. En el análisis de caspasa-1 no se observó un punto de corte en la secuencia de aminoácidos.



Figura 21. Árbol filogenético de la proteína NS4A.

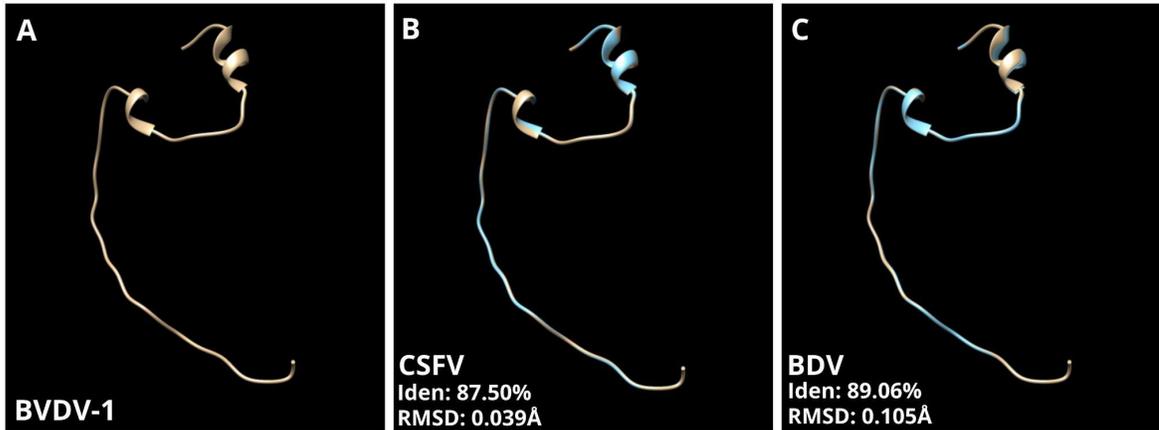


Figura 22. Modelos proteicos de la proteína NS4A. A. Modelo proteico en listones de la proteína NS4A de BVDV-1. B. Comparaciones estructurales de los modelos proteicos de BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). C. BVDV-1 (dorado) y BDV (azul).

El árbol filogenético construido para la proteína NS4B (Fig. 23), este árbol nos muestra diferentes ramificaciones que dieron origen a algunos biotipos de BVDV-1 agrupados en un árbol monofilético. Se observa que un mismo ancestro en común dio origen a la proteína de CSFV y BDV mientras que para BVDV-1 se ramificó y posterior a esto se hizo una divergencia evolutiva entre BVDV-1 y los biotipos no citopático (BVDV1-NCP821) y citopático (BVDV1-CP821) de la misma manteniéndose BVDV-1 el grupo ancestral de estos dos biotipos. Aquí la separación de CSFV y BDV es evidente al ver el porcentaje de identidad obtenido en el BLASTp donde se obtuvieron valores de 78.39% y 76.37% respectivamente, a diferencia de BVDV-1. Para esta proteína no fue posible realizar modelos proteicos debido a la falta de templado y en el caso de la escisión de caspasa-1 no se observó un punto de corte para esta proteína.

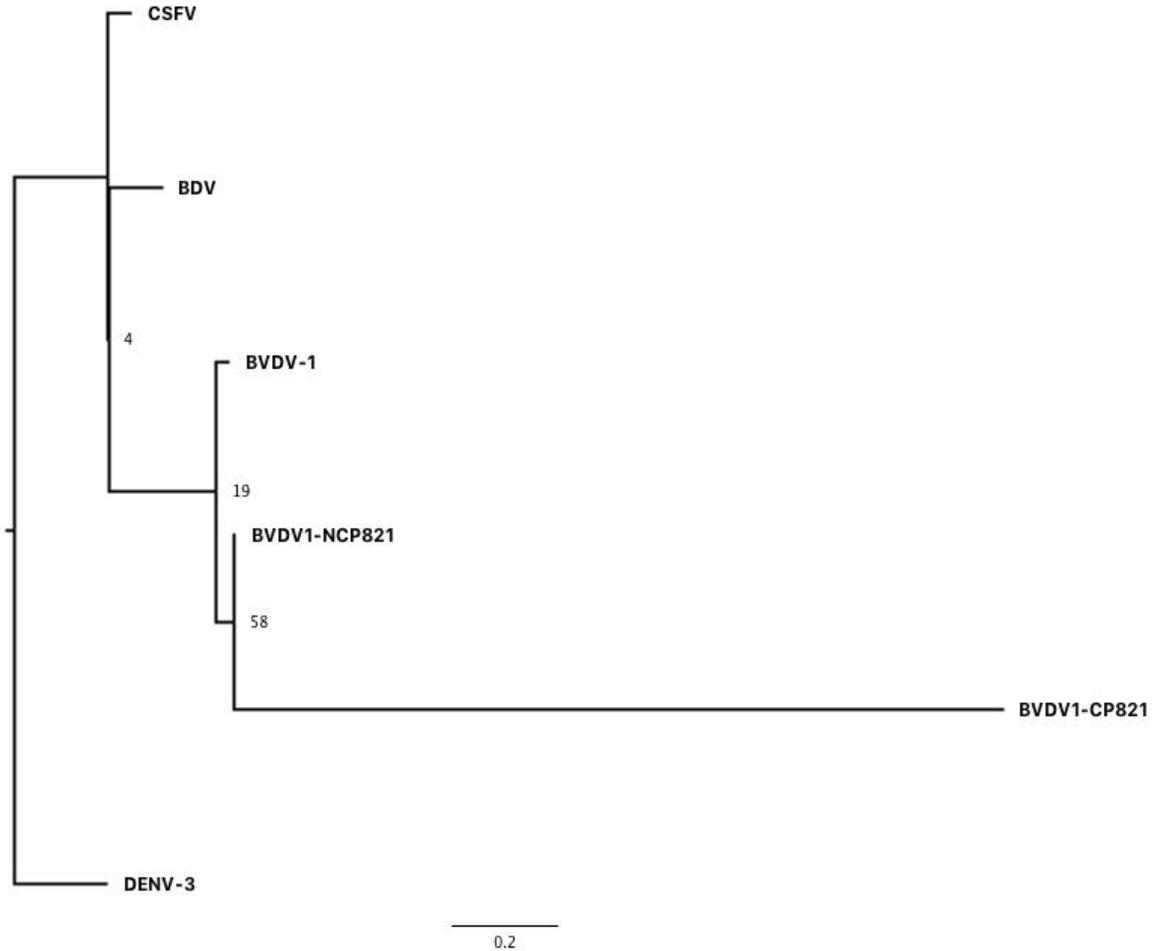


Figura 23. Árbol filogenético de la proteína NS4B.

Se analizaron las proteínas NS5A y NS5B, que son importantes tanto en la evasión de la respuesta inmune como en la replicación del virus. En el árbol filogenético para la proteína NS5A (Fig. 24) se observa la separación de BVDV-1 con otros virus de la familia viral. Aquí es importante resaltar que existió una separación evolutiva de BVDV-1 con otros *Pestivirus*, pero CSFV y BDV tienen un grupo ancestral más cercano entre sí. Este árbol se encuentra separado en dos clados, el clado I (naranja) compuesto únicamente por *Pestivirus* que se encuentran internamente organizados en un grupo monofilético y el clado II (verde) compuesto por *Hepacivirus* y *Pegivirus*, los *Flavivirus* no se encuentran en el árbol ya que solo tienen proteína NS5. En los modelos proteicos de NS5A (Fig. 25) donde se aprecia que CSFV (Fig. 25B) y BDV (Fig. 25C) tienen únicamente 57.75% y 59.15% de

porcentaje de identidad, respectivamente. En el caso de todos los virus comparados (Figs. 25B a 25E) se aprecian valores de RMSD superiores a 2Å. Se muestra el punto de corte de caspasa-1 (Fig. 26) donde se observa el corte en el aminoácido 48 correspondiendo a ácido aspártico (D).

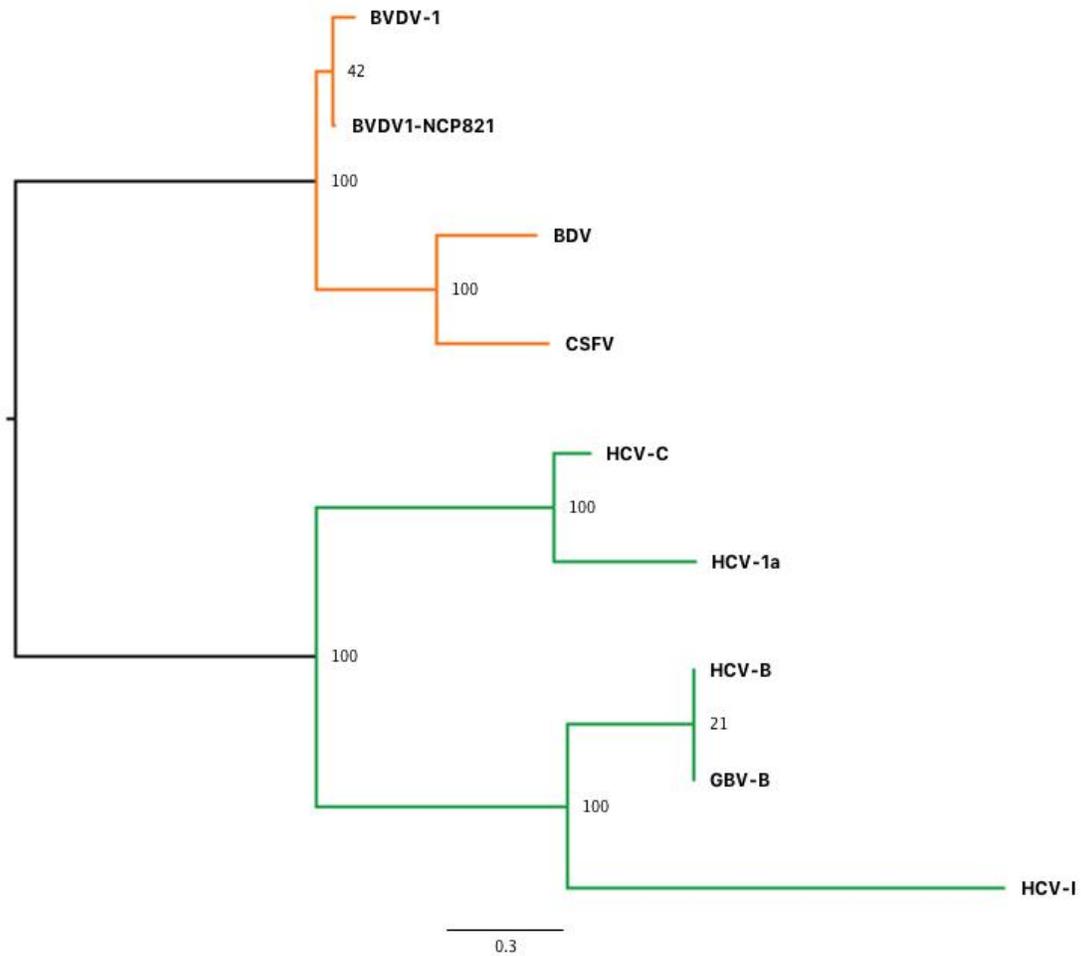


Figura 24. Árbol filogenético de la proteína NS5A.

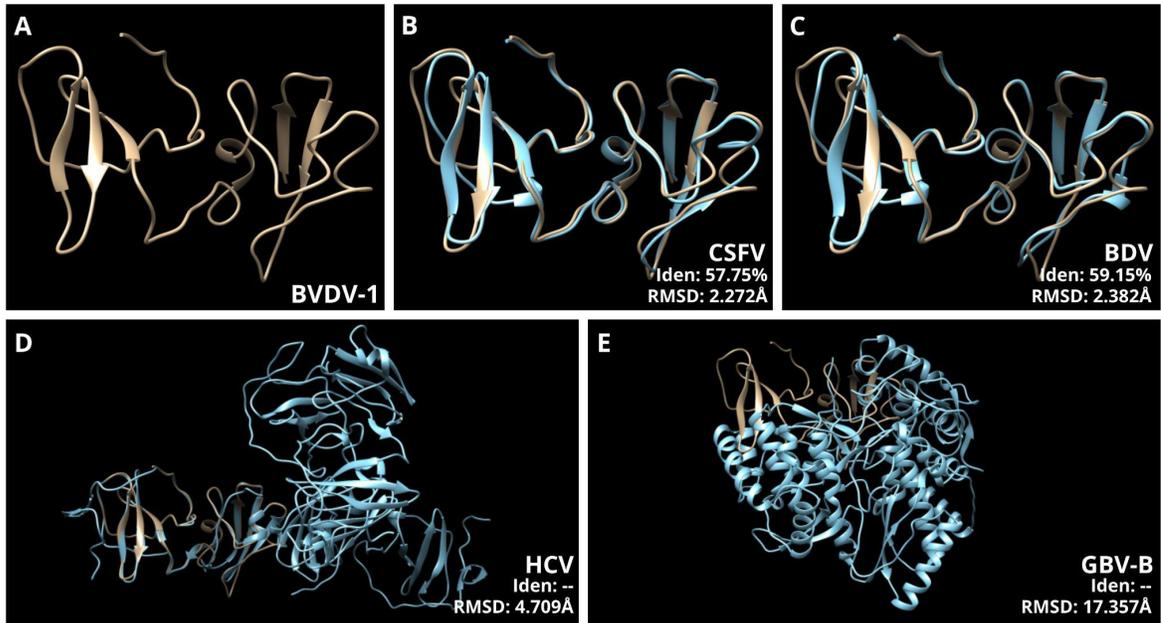
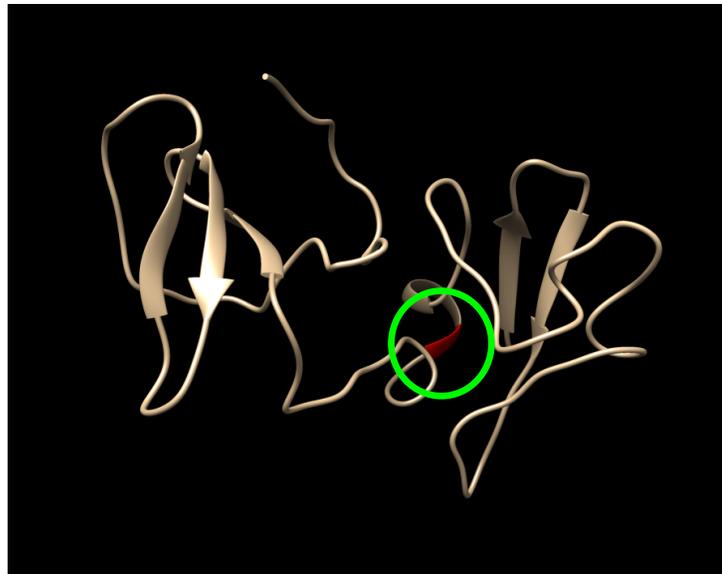


Figura 25. Modelos proteicos de la proteína NS5A. A. Modelo proteico en listones de la proteína NS5A de BVDV-1. B. Comparaciones estructurales de los modelos proteicos de BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). C. BVDV-1 (dorado) y BDV (azul). D. BVDV-1 (dorado) y HCV (azul). E. BVDV-1 (dorado) y GBV-B (azul).



Casp1

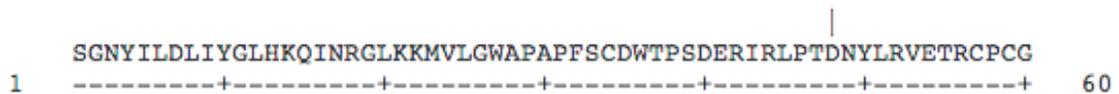


Figura 26. Corte de caspasa-1 a la proteína NS5A. Modelo proteico en listones de la proteína NS5A señalado en rojo y rodeado de un círculo verde el posible sitio de corte de caspasa-1. En la secuencia se muestra el posible punto de corte de caspasa-1.

En el árbol filogenético de la proteína NS5B (Fig. 27) se observa una separación de CSFV y BDV con BVDV-1 pues existió un evento de diferenciación evolutiva que separó a CSFV de BDV y BVDV-1 que se encuentran juntos en un mismo clado. Se utilizó el virus del Dengue tipo 3 (DENV-3) como outgroup para establecer la raíz del árbol. Los porcentajes de identidad obtenidos en el BLASTp (Fig. 28) muestran 70.69% para CSFV (Fig. 28B) y 70.93% para BDV (Fig. 28C) y valores de RMSD lejanos a 1Å, pues aunque se encuentren en el mismo clado BVDV-1 y BDV, las ramas son largas, lo que sugiere cambios en la tasa de mutación. Esta proteína tiene un dominio proteico importante para la replicación viral, por esto se realizó un análisis estructural de este dominio. En el estudio de caspasa-1 no se encontró un punto de corte a la proteína.

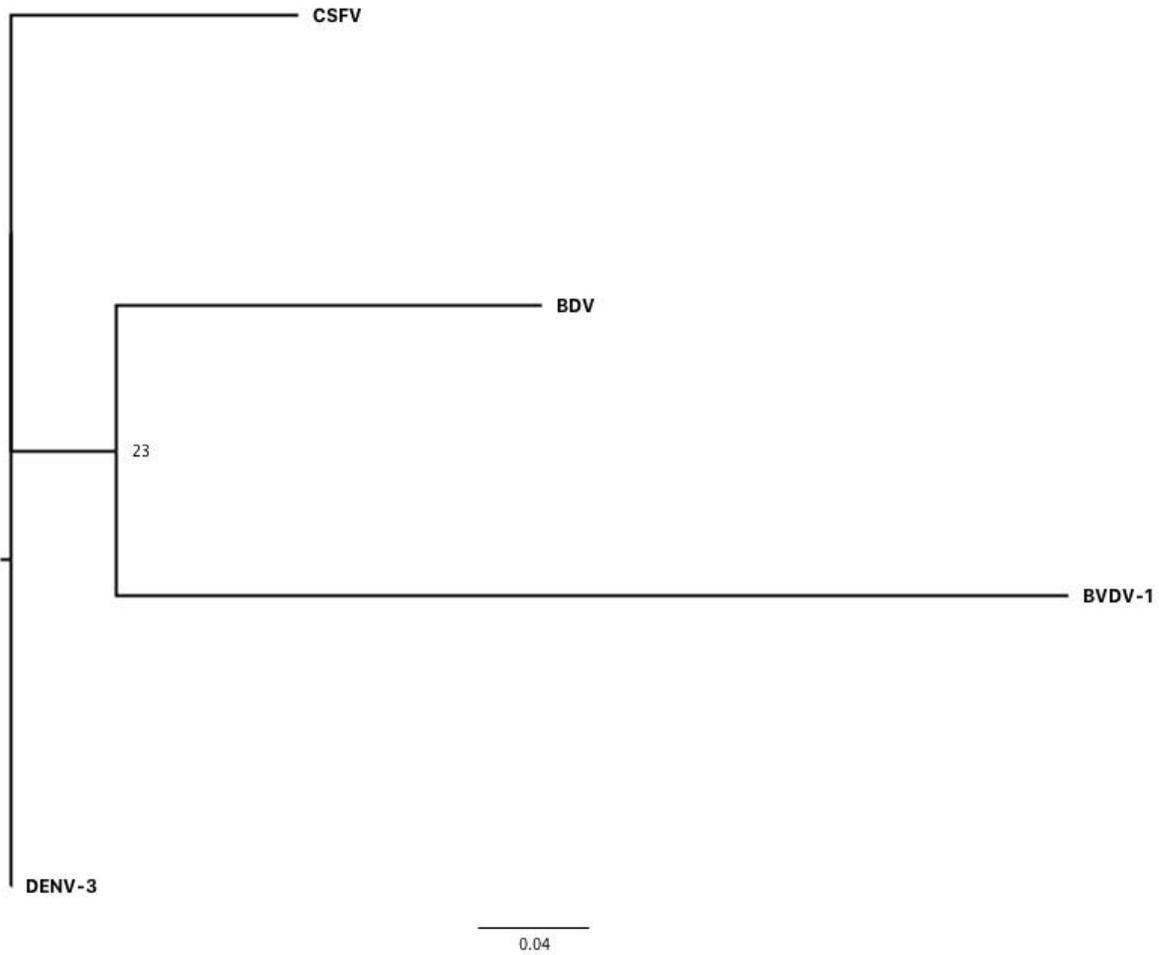


Figura 27. Árbol filogenético de la proteína NS5B.

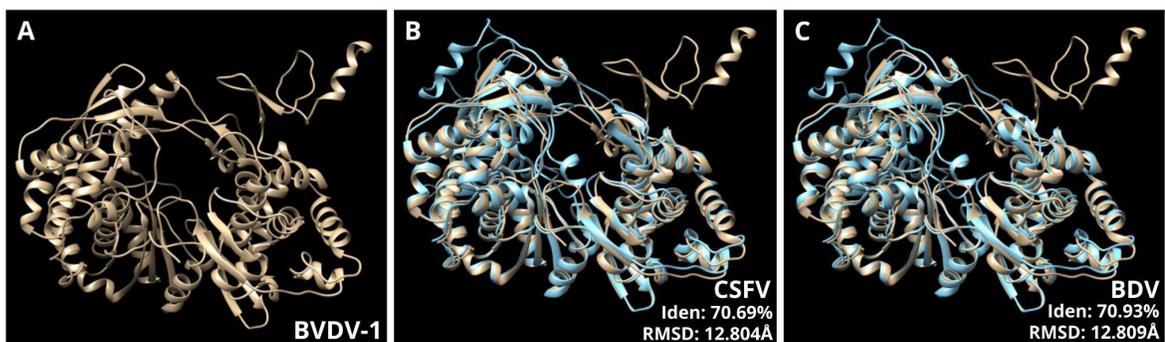


Figura 28. Modelo proteico de la proteína NS5B. A. Modelo proteico en listones de la proteína NS5B de BVDV-1. B. Comparaciones estructurales de los modelos proteicos de BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). C. BVDV-1 (dorado) y BDV (azul).

El dominio mostrado en la Figura 29 nos indica la similitud que tiene este dominio con otros virus de la familia, observamos 72.59% de porcentaje de identidad con CSFV (Fig. 28B) y 74.81% con BDV (Fig. 29C) y valores de RMSD de 0.660Å y 0.662Å, respectivamente, lo que nos indica que estos dominios son homólogos los dominios. Los valores de RMSD son menores a 1Å, esto podría indicarnos que la diferenciación evolutiva radica en la parte estructural del resto de la proteína y no en el dominio.

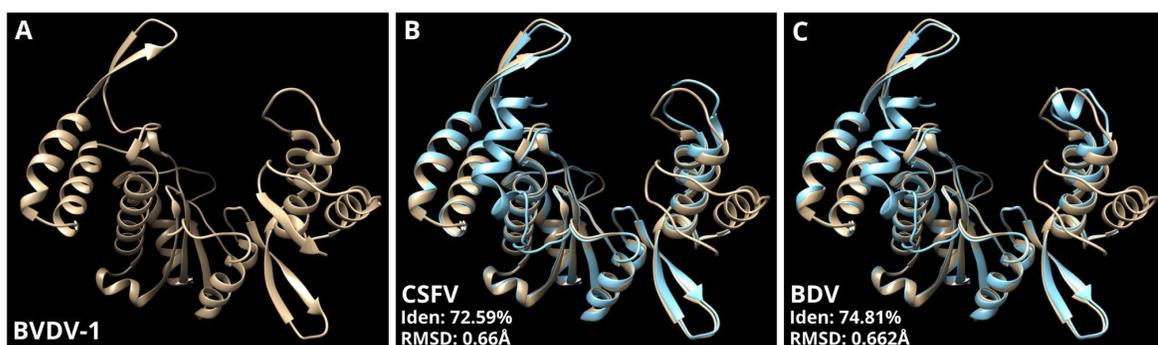


Figura 29. Modelo proteico del dominio RdRP\_3 de la proteína NS5B. A. Modelo proteico en listones del dominio RdRP\_3 de la proteína NS5B de BVDV-1. B. Comparaciones estructurales del dominio RdRP\_3 de la proteína NS5B de BVDV-1 (dorado) y CSFV (azul). C. NS5B de BVDV-1 (dorado) y BDV (azul).

En los posibles cortes por caspasa-1 (Cuadro 4) encontrados en cada una de las proteínas y los virus en los cuales existe un posible corte para la misma proteína, la proteína de BVDV-1 se observa en la primera columna. En la segunda columna la predicción de corte por caspasa-1 en la proteína de BVDV, en la tercera columna se presentan los sitios de escisión de caspasa-1 en la proteína y en la cuarta columna observamos los otros virus de la familia *Flaviviridae* que tuvieron cortes en proteínas similares a las presentadas por BVDV-1.

Cuadro 4. Interacciones de caspasa-1 con BVDV-1 y otros virus.

Proteína	Escisión por caspasa-1	Sitios de corte	Otros virus escindidos
Npro	No		
Capside	No		WLSV
Erns	Sí	D 48	BVDV-2, BVDV-3
E1	No		ZIKV, GBV-B, WLSV, SLEV, CxFV, MECDEV, HANKV, HCV-B, HCV-I
E2	No		CSFV, HCV-M
p7	No		BVDV-1b
NS2-3	Sí	D 74, D 157	CSFV, BDV, BVDV-1b, BVDV-2, BVDV-3, GBV-B, HCV-3, KUNV, WLSV, HCV-B, LPKV
NS3	No		ZIKV, DENV-1, DENV-2, DENV-4, HCV-M, HCV-C, HCV-3, WLSV, EPgV, MECDV, HANKV, TABV, CFV, YFV
NS4A	No		CxFV, HANKV
NS4B	No		BVDV-1ncp821, MECDV, HANKV, HCV-I
NS5A	Sí	D 48	BVDV-1b, BVDV-1ncp821, EPgV, MECDV, CFV, YFV, NAKV, LTNV, KRBV
NS5B	No		WLSV, EPgV

Cuadro 4. Interacciones de caspasa-1 con BVDV-1 y otros virus. La columna “Proteína” señala la proteína de BVDV-1 que se comparó contra los otros miembros de la familia *Flaviviridae* estudiados. La columna “escisión por caspasa-1” indica si existe un corte de caspasa-1 hacia las proteínas de BVDV-1. La columna “Sitios de corte” menciona el aminoácido y el sitio en el que escinde a la proteína de BVDV-1 y la columna “otros virus escindidos” indica los virus de la familia *Flaviviridae* estudiados que pueden ser escindidos en la proteína con similitud a la de BVDV-1.

## DISCUSIÓN

Este estudio analiza la posible implicación de caspasa-1 en la interacción con las proteínas del BVDV-1 y de la familia *Flaviviridae* para inferir su posible participación que podría ser conservada de acuerdo a las similitudes filogenéticas y estructurales de las proteínas de BVDV-1.

Las caspasas son cisteín-proteasas con una triada catalítica compuesta por cisteína (C), histidina (H) y ácido aspártico (D) que pueden escindir triptófano (W) y tirosina (Y) (Denault *et al.*, 2001). La caspasa-1 tiene diferentes puntos en los que podría escindir a la poliproteína del BVDV-1, lo que podría ser la causa de un aumento en la replicación viral observado en el artículo por Morales-Aguilar *et al.* (2020). Es por esto que se hizo la predicción del corte por caspasa-1 a las proteínas virales, donde se obtuvieron cuatro posibles sitios de corte en la poliproteína de BVDV-1 y predicciones de cortes en otras proteínas de virus de la familia (Cuadro 3). Además, se realizaron los árboles filogenéticos y los modelos proteicos para identificar similitudes, homología en secuencia y estructura de las proteínas virales de esta familia para posibles sitios de corte conservados en una familia e hipotetizar los posibles efectos que tengan estos cortes.

Los experimentos *In silico* han sido utilizando ampliamente para realizar diferentes predicciones evolutivas, de acoplamiento, etc., como en el caso del artículo de Suzuki y Gojobori en 1997 en el que encontraron la cercanía entre distintas cepas de Ébola y el virus de Marburg en sus diferentes genes. En 2020 Benvenuto y colaboradores realizaron una serie de árboles filogenéticos para demostrar cómo había evolucionado el virus del SARS-CoV a SARS-CoV-2 y cómo este seguía evolucionando. En un reporte de investigación por Piplani y colaboradores en 2021 se utilizaron modelos *In silico* de construcción de proteínas por homología para tener un mejor entendimiento de la susceptibilidad de diferentes huéspedes a SARS-CoV-2 por su proteína ACE2. Este tipo de herramientas pueden ayudar a optimizar el uso de recursos *in vitro* e *in vivo*. En esta sección se discuten los resultados obtenidos de la experimentación *In silico*.

La proteína NS3 es una de las principales proteínas implicadas en la replicación del virus y en el ensamblaje del virión. Además, es una importante proteasa porque corta a la poliproteína para dar origen a las proteínas NS2/NS3, NS4A/NS4B, NS5A/NS5B (Knipe, 2013). Esta proteína podría ser la más conservada de la familia, ya que en el BLASTp tuvo similitud con 35 virus de todos los géneros de la familia (Fig. 16), el cual cuenta con un respaldo estadístico de hasta 100% en algunos nodos. Esta proteína tuvo similitud, incluso, con algunos virus que aún no están clasificados en algún género.

Los modelos proteicos nos muestran la similitud que existe en los dominios peptidasa y dead-like helicasa de la proteína NS3 entre BVDV-1 y CSFV y BDV encontrando porcentajes mayores al 90% de similitud en el dominio dead-like y cercanos al 90% en el dominio peptidasa, los cuales pertenecen al género *Pestivirus*. Para los géneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus*, los porcentajes de identidad en estos dominios fueron, en su mayoría, menores a 30% y se observaron valores de RMSD mayores a 1, esto nos indica que no son homólogos (Barnet *et al.*, 2022) con BVDV-1 y que además, estructuralmente, estos dominios no son parecidos ni son el mismo. Esto podría sugerir que la función es diferente sin embargo, se ha observado que la función para estos dominios permanece (Knipe, 2013) a pesar de estos cambios en secuencia y estructura en los diferentes géneros lo que podría ser debido a las otras proteínas que participan acoplándose para la realización de la función. En el dominio peptidasa, la tríada catalítica se conserva dentro de toda la familia viral, incluso aunque el dominio tenga porcentajes de identidad bajos con los otros géneros.

Los dominios proteicos son unidades funcionales y/o estructurales de una proteína. En algunos casos la proteína es el dominio y en otros, cuentan con dos o más dominios. Usualmente los dominios son responsables de una función o interacción particular que contribuye a la función general de la proteína, pueden existir los mismos dominios en diferentes proteínas (EBML, 2022). El dominio peptidasa de la proteína NS3 es una serine-proteasa en el que se encuentra la tríada catalítica y tiene la función de escindir otras proteínas de la poliproteína (Knipe, 2013). Este tipo

de dominios son enzimas que escinden los vínculos entre péptidos en los que la serina sirve como aminoácido nucleofílico en el sitio activo (Sandle, 2016). Cerca de un tercio de las proteasas conocidas son serine-proteasas, entre ellas se encuentran la tripsina, nucleoporina, aminopeptidasa y la lactoferrina (Di Cera, 2009). El dominio Dead-like helicasa pertenece a una superfamilia de helicasas, en general, su función involucra el metabolismo del RNA y juega un papel importante en el reconocimiento de ácidos nucleicos y modulación de la infección viral y así evadir la respuesta inmune (Taschuk *et al.*, 2020).

Al realizar el análisis de la escisión por caspasa-1, la proteína NS3 de BVDV-1 no tuvo un posible sitio de corte. Sin embargo, se encontró que 12 virus de la familia pueden ser escindidos en esta proteína. Estos virus pertenecen al género *Flavivirus* y se encuentran divididos entre los clados I y II del árbol filogenético (Fig.16), es posible que antes de la separación en su historia evolutiva, tuvieron serie de acumulación de mutaciones en NS3 que se conservó para este género, por lo que se mantiene el posible sitio de corte, pero no para los demás géneros. Es importante mencionar que no se obtuvo una predicción de corte en ninguno de los dominios funcionales de la proteína de BVDV-1 por lo que podría no estar afectando la replicación del virus.

Así mismo, todos los virus que tuvieron similitud en esta proteína, específicamente, en el dominio peptidasa, mantuvieron la triada catalítica alineada, la cual está conformada por los aminoácidos histidina (H), ácido aspártico (D) y glicina (G) (Knipe *et al.*, 2013). Esto podría indicarnos que el mecanismo de acción de la proteasa es parecido en todos los virus y que tienen un mismo ancestro común lo que significa que, al ser conservada la triada catalítica, si un virus de la familia por medio de NS3 es capaz de escindir a caspasa-1, todos los virus de la familia podrían hacerlo también. La triada catalítica se mantiene conservada en todos los virus analizados, esta región conservada en la cadena de aminoácidos podría indicar que para la funcionalidad del virus es necesario que se mantenga la triada catalítica, una alteración en esta podría indicar que las proteínas del virus ya no pueden escindirse

y es por esto que se mantiene la secuencia a pesar de las mutaciones. La triada catalítica podría estar interactuando con caspasa-1, como se observó en el artículo de Morales-Aguilar en 2020, esto podría observarse analizando las secuencias mediante docking y estudios *In-vitro* únicamente con la proteína NS3.

Cabe resaltar que aunque NS3 no tuvo un posible sitio de corte en BVDV-1, NS2-3 tuvo dos posibles sitios de corte por caspasa-1, , los cuales no fueron en ningún dominio funcional de la proteína sino en regiones muy cercanas al inicio de la proteína, en los aminoácidos 74 y 154, que es una región no traducida de la proteína y una región de corte por NS3, respectivamente. La posible escisión en esas regiones podría mantener la funcionalidad de la triada catalítica pues esta no se ve afectada por una escisión por caspasa-1. El sitio de corte por NS3 separa las proteínas NS2 y NS3 de la poliproteína, esto podría significar que caspasa-1 facilita la escisión de proteínas y su función y por lo tanto la replicación del virus. La proteína NS2-3 es una proteína que se encuentra en BVDV biotipo no citopático (ncp), el cual, se sabe que tiene la capacidad de inhibir la apoptosis debido a su baja tasa de replicación.

El BVDV cepa NADL promueve también la secreción de IL-1 $\beta$ , que podría indicar la activación del inflamasoma NLRP3 (Morales-Aguilar *et al.*, 2020). En el *Hepacivirus C* (HCV) también se ha observado que estas bajas tasas de replicación, que significan poco RNA viral en la célula, ayudan al virus a evadir la respuesta inmune, esto puede facilitar la existencia de una infección persistente (Yamane *et al.*, 2006).

El árbol filogenético de la proteína NS2-3 muestra similitud entre BVDV-1 y CSFV y BDV (Fig. 12) y los modelos proteicos (Fig. 13). En la comparación de BVDV-1 con CSFV las estructuras muestran un RMSD más bajo (1.1Å) que en la comparación de BVDV-1 con BDV (1.152Å), pero el porcentaje de identidad es más elevado en la comparación con BDV (73.82%) que con CSFV (72.62%). Aunque la diferencia no es grande, podría indicar que algunos cambios de aminoácidos en la secuencia

de BDV resultaron en un cambio de estructura y en CSFV no y que esto tuvo mayor peso evolutivamente y por esto se hizo la separación de BVDV-1 y CSFV con BDV.

Para comparar con mayor exactitud esta relación evolutiva, se realizó el modelo proteico del dominio Jiv de NS2-3 también llamado Jiv90. Este dominio se encuentra en la proteína NS2 y es el que tiene la capacidad de escindir la proteína NS2-3 para regular el efecto citopático del virus en las células (Kameyama *et al.*, 2008). En los modelos proteicos pudimos observar similitudes en este dominio cercanas al 50% con los otros *Pestivirus*, por lo que no se consideran proteínas homólogas (Barnet *et al.*, 2022). Sin embargo, en la comparación estructural, se obtuvieron valores menores a 0.05Å, lo que indica que sus átomos se encuentran muy cercanos entre sí. Esto sugiere que tienen un mismo origen evolutivo y por lo tanto podría indicar que la función es la misma. Para tener mayor exactitud en estos resultados es necesario contar con un banco de secuencias más amplio, con más cepas y variantes de cada uno de los virus.

La proteína Erns es una proteína que sólo se encuentra en *Pestivirus*, es por esto que no fue sorpresa no observar similitud con ningún virus, incluso perteneciendo al mismo género, esto puede sugerir que es una proteína especializada y única para cada *Pestivirus*. Para BVDV-1 esta proteína tuvo un posible corte por caspasa-1 en el aminoácido 48 el cual no escinde un dominio funcional de ésta. En otros virus como BVDV-3 y BVDV-2, en los que se encontraba la secuencia de la poliproteína completa, se pudo observar una posible escisión por caspasa-1, que puede deberse a una falta de variabilidad en la proteína. Este posible corte podría facilitar la unión de la proteína a RNA de baja afinidad para que el RNA viral pueda replicarse. Una de las funciones para evadir la respuesta inmune de esta proteína es degradar la cadena sencilla de RNA viral para no ser detectado por el sistema inmune (Lussi *et al.*, 2021), esta función también podría ser facilitada por ese corte de caspasa-1 al dejar libre el dominio funcional de la proteína.

NS5A es una proteína que regula la replicación del RNA viral. La proteína NS5A puede ser escindida por caspasa-1 pero únicamente en BVDV en sus diferentes cepas y para algunos *Flavivirus* en NS5 y para *Hepacivirus* también en NS5B, esto podría deberse a su capacidad de inhibir la apoptosis y la escisión podría estar favoreciendo la formación de complejos de replicación y la localización de síntesis de RNA debido a que escinde en el aminoácido 48, siendo este un punto cercano al que escinde la proteína NS3 del virus para comenzar con la replicación viral.

En el árbol filogenético (Fig. 24) se presentan dos cladogramas, en el clado I se observan *Pestivirus* y en el clado II *Hepacivirus* y *Pegivirus*. Se hace notoria la diferencia de CSFV y BDV con BVDV-1, pues en la comparación los porcentajes de identidad no rebasan el 60% a diferencia de otras proteínas. Además, los valores de RMSD son superiores a 1, lo que indica que las proteínas en secuencia y estructura son diferentes. La diferencia entre estos virus podría indicar una especialización de la proteína para permitir la replicación viral en células de diferentes animales, ya que se ha observado similitud serológica entre CSFV y distintos pestivirus de ovinos (Casciari *et al.*, 2020). Con esto, se puede sugerir que esta proteína ha mutado para poder facilitar la replicación del virus en células de diferentes animales, lo cual se puede comprobar realizando un análisis en células de los diferentes huéspedes.

La caspasa-1 es hipotéticamente capaz de escindir varias proteínas de la familia *Flaviviridae*, aunque BVDV-1 solo es susceptible a corte en las proteínas NS2-3, Erns y NS5A. Por otro lado, para BVDV-1 ncp se obtuvieron varios posibles puntos de corte en una región que comprende a las proteínas NS4A, NS4B y NS5A, esto podría deberse a que la caspasa-1 podría cortar en algún punto similar que la proteína NS2-3 para poder separar las proteínas de la poliproteína, pero debido a la falta de información sobre las regiones comprendidas en esa secuencia, no es posible determinar en qué proteína exactamente se encuentra la posible escisión de caspasa-1. Sugerimos que futuros estudios deben priorizar la secuenciación completa de la proteína y la secuenciación de más cepas de la familia *Flaviviridae*.

La proteína E2 no puede escindirse en BVDV-1 pero sí en CSFV y otros virus como el *Hepacivirus M* y en virus como Wenling shark, encefalitis de Saint Louis, *Culex flavivirus*, *Mercadeo virus* y *Hanko virus* en los que la proteína es llamada proteína E. La proteína E1 de algunos virus como Hepatitis GB virus B, Hepatitis B y Hepatitis I puede ser escindida. Se obtuvieron tres posibles sitios de escisión en estas proteínas, los cuales pueden ocurrir en tres diferentes géneros. En el presente trabajo se identificó que existe una conformación de aminoácidos similar en la región donde se presenta el posible sitio de corte para todos estos virus, pero esta región se localiza en distintos puntos de las proteínas. Esto podría deberse al mantenimiento de este sitio de corte proveniente de un ancestro común pero acompañado de diferentes mutaciones en otras proteínas, lo que cambió su localización manteniendo la conformación de aminoácidos similar en estos virus. Para observar esto, sería necesario realizar un árbol filogenético con otro modelo evolutivo diferente a Maximum-Likelihood acompañado de un análisis proteico que incluya un análisis de las alpha helices y láminas beta así como el análisis evolutivo para cada sitio activo proteico.

Se ha demostrado que la proteína C de algunos virus del género *Flavivirus* es capaz de inhibir la apoptosis (Pan *et al.*, 2021) y algunas otras proteínas como NS2, NS3, NS4 y la proteína E pueden inducir la apoptosis (Gosh Roy *et al.*, 2014). En el estudio de Schweizer y Peterhans (2020) se menciona que los *Hepacivirus* pueden inhibir la apoptosis gracias a la proteína NS5 la cual es similar a la proteína NS5A del BVDV que, al igual que la proteína NS5 de los *Hepacivirus*, también inhibe el interferón. Esto nos lleva a pensar que la similitud entre proteínas podría significar una acción similar en cuanto a la evasión de la respuesta inmune. La proteína NS2 en los *Hepacivirus* también puede inhibir la apoptosis (Chen *et al.*, 2017).

El BVDV tiene dos diferentes proteasas, la proteasa NS3 anteriormente mencionada y la auto-proteasa Npro. Esto podría significar que cualquiera de estas dos podrían escindir a caspasa-1 u otras caspasas o proteínas. A pesar de tener valores de RMSD altos y de porcentaje de identidad bajos al comparar con virus de los géneros

*Hepacivirus* y *Pegivirus*, la poliproteína de esta familia viral contiene la proteasa NS3 en todos los virus de la familia como se mencionó anteriormente.

La proteasa Npro, solo se encuentra en virus del género *Pestivirus*, aunque la proteína NS1 del DENV-4 se alineó con esta proteasa, no cuenta con la tríada catalítica y su función es diferente por lo que solo se utilizó como grupo externo. En la Figura 2 se observa el árbol filogenético construido, donde nos muestra la historia evolutiva de la proteína Npro, se aprecia una separación de BVDV-1 con BDV y CSFV. La tríada catalítica de esta proteína, compuesta por glicina (G), histidina (H) y cisteína (C) se alineó en las secuencias de los virus del género *Pestivirus*, en este caso, la proteína tiene valores bajos de RMSD y altos en porcentaje de identidad, por lo que podríamos catalogarla como homóloga en estos virus. Esta proteína podría escindir, igual que la NS3, a la caspasa 1 u otras caspasas o proteínas. Para observar esta posible interacción sería necesario realizar un docking para estas dos proteínas y posteriormente realizar experimentos *in vitro*.

En los árboles filogenéticos podemos observar que BVDV-1, CSFV y BDV se encuentran cercanos entre sí, incluso en el árbol en el cual tuvimos más secuencias para comparar (Fig. 16), y que se obtuvieron porcentajes de identidad mayores al 70% y al comparar la estructura observamos valores de RMSD menores a 1, esto nos podría indicar que, en su mayoría, las proteínas de estos virus son homólogas (Barnett *et al.*, 2022) y que estructuralmente los átomos se encuentran posicionados de manera similar.

Los árboles filogenéticos fueron realizados basándose en un modelo de Maximum-Likelihood, esto quiere decir que nos muestra el árbol más probable de ocurrir y, en cada nodo, el respaldo estadístico de ocurrencia (Baum *et al.*, 2013). En los diferentes modelos se observan valores de RMSD (root-mean-square deviation) distintos entre sí, estos nos indica el promedio de la distancia entre grupos de átomos, entonces al comparar dos proteínas, el RMSD nos indica qué tan diferente es la disposición de los átomos entre una y otra (Aguilar, 2021).

Existen varios casos en los que pestivirus de ovinos son similares a CSFV. En el 2020 se publicó un reporte de caso en el que Casciari y colaboradores identifican un nuevo pestivirus ovino y lo relacionan serológicamente con otros virus, siendo CSFV el más parecido, ese mismo pestivirus ovino se observa en la Figura 5, siendo cercano a CSFV con una probabilidad de ocurrencia del 81%. En la mayoría de los árboles existe una cercanía entre virus de ovinos y de porcinos con una separación de BVDV-1, lo que podría deberse al tipo de producciones, distribución mundial, animales que son mantenidos juntos, entre otros factores, esto nos presenta un nuevo campo para explorar.

En la Figura 8, el árbol para la proteína E1 nos muestra un grupo monofilético, en este grupo se comienza la separación de un virus de ovinos en Tunisia con CSFV y de ahí observamos como los nodos comienzan a descender uno del otro hasta llegar al pestivirus atípico del porcino, en este caso observamos muchas cepas diferentes de BVDV, esto explica la existencia de un árbol con grupo monofilético además del antecedente de los virus de porcinos teniendo similitud serológica con *Pestivirus* de rumiantes, específicamente de ovinos.

En la proteína E2 se utilizó un outgroup para poder obtener un árbol más preciso, aquí observamos, a diferencia de los otros árboles, una similitud de CSFV con BVDV-1. Esta es la proteína que se utiliza para que el virus ingrese a la célula (Knipe, 2013) y se han reportado porcinos infectados con BVDV (Tao *et al.*, 2013), estas infecciones podrían deberse a la similitud entre esta proteína y el que sean evolutivamente más parecidas entre sí que con otros *Pestivirus*.

En la proteína p7 se observa la misma diferenciación que en E2, donde CSFV y BVDV-1 comparten una separación dentro de la misma rama pero se observa que la rama de BVDV-1 es más larga, indicando que hubo implicados más procesos evolutivos para llegar a BVDV-1 que para CSFV. Observamos en este árbol el hepacivirus M que se encuentra separado completamente de los *Pestivirus*.

La proteína NS4A presenta un árbol con un nodo de 100% de probabilidad encontrado en la separación evolutiva entre CSFV y BDV, esta relación ha sido mencionada antes y es posible visualizarla en el árbol de la Figura 21. En la Figura 22 se observan los modelos proteicos de NS4A, los cuales, en su comparación de BVDV-1 con CSFV y BDV, presentan los valores de RMSD más bajos de este trabajo. Se puede apreciar que las proteínas son prácticamente iguales y basándonos en los valores de RMSD y porcentajes de identidad nos indican que son proteínas homólogas entre estos virus.

NS4B es una proteína en la que se obtuvieron secuencias de BVDV biotipo citopático y no citopático, esta proteína interactúa con NS3 para formar el complejo de replicación (Knipe, 2013) es por esto que la distancia evolutiva de BVDV1-cp821 se vuelve relevante debido a que esta cepa es citopática, a diferencia de BVDV-1 que es no citopática y se hace la diferenciación con cepas no citopáticas e incluso con otros *Pestivirus* en el árbol filogenético. La distancia entre una cepa no citopática y una cepa citopática en el árbol nos hace pensar que la existencia de estos dos biotipos se debe a una ruta de evolución diferente y no a una ocurrencia al azar por parte del virus y podría ayudar a elucidar el porqué existen estas dos cepas en este virus.

En la proteína NS5B, se observa una relación entre BVDV-1 y BDV que no existe con CSFV pues está evolutivamente separada, aunque en los modelos proteicos se observan porcentajes de identidad de 70% que indicarían homología (Barnett et al., 2022), en la comparación estructural se aprecian valores de RMSD superiores a 1, la lejanía de los átomos podría indicar que no necesariamente son proteínas homólogas. Esta proteína cuenta con el dominio RdRP\_3 que es parte de una familia de RNA polimerasa dependiente de RNA. El estudio de este dominio se realizó para determinar si eran homólogas o solo funcionalmente similares. Este dominio se encuentra conservado en los virus con similitud en esta proteína y nos indica que estos virus podrían tener la misma función pero los porcentajes de identidad y valores de RMSD para la proteína completa no son suficientemente altos

o bajos, respectivamente, para indicar homología. Para tener una mayor precisión en estos datos, se podría realizar un banco de secuencias más amplio utilizando secuencias de otras bibliotecas.

Esta familia viral tiene muchas particularidades que podrían ser estudiadas, una de ellas son las regiones 5' y 3' de los distintos virus, pues son utilizadas para la caracterización de algunos virus, especialmente del virus de diarrea viral bovina, en el que la región 5' es utilizada para la identificación de genotipos y subgenotipos (Borin, 2022). Adicional a esto, la realización de un estudio en el que se comparen los diferentes subgenotipos de diarrea viral bovina con otros virus de la familia viral *Flaviviridae* podría arrojar información más detallada sobre las particularidades y similitudes de cada virus.

## CONCLUSIONES

- Los análisis de predicción muestran que las proteínas Erns, NS2-3 y NS5A de BVDV-1 pueden ser escindidas por caspasa-1.
- NS3 es la proteína evolutivamente más conservada dentro de la familia *Flaviviridae*.
- NS4A es la proteína estructuralmente más conservada dentro del género *Pestivirus*.
- Los virus de fiebre porcina clásica y enfermedad de las fronteras son los que tienen mayor similitud en su poliproteína con el virus de diarrea viral bovina.
- NS5B es la proteína evolutiva y estructuralmente menos conservada dentro de la familia *Flaviviridae* sin embargo, es probable que mantenga la función en su dominio RdRP\_3.
- La proteína NS5A es filogenética y estructuralmente conservada en el género *Pestivirus* y caspasa-1 es capaz de escindirla en el aminoácido 48 (ácido aspártico).

## REFERENCIAS

1. Aguilar, C. Análisis computacional de secuencias de ADN. UNAD: Universidad abierta y a distancia de México [Internet]. 2021 [citado el 8 de agosto de 2022]. Disponible en: [https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE1/BI/07/BIIN/unidad\\_02/descargables/BIIN\\_U2\\_Contenido.pdf](https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE1/BI/07/BIIN/unidad_02/descargables/BIIN_U2_Contenido.pdf) 08 ago 2022
2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. 1990 [citado el 18 de marzo de 2023]; 215: 403-41.
3. Animal Health Diagnostic Center. Bovine Viral Diarrhea: Background, management and control [Internet]. Cornell University College of Veterinary Medicine. 2019 [citado el 9 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/programs/nyschap/modules-documents/bovine-viral-diarrhea-background-management-and-control>
4. Arroyave-Ospina, J., Caicedo, M.F., Navas, M.C., Cortés-Mancera, F.M. Human *Pegivirus*: Pathogenic potential and non-Hodgkin lymphoma development risk. Revista chilena de infectología [Internet]. 2018 [citado 22 noviembre 2021]; 35 (2). Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071610182018000200164&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071610182018000200164&script=sci_arttext&tlng=en)
5. Avirutnan, P., Hauthart, R.E., Somnuk, P., Blom, A.M., Diamond, M.S., Atkinson, J.P. Binding of *Flavivirus* Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation. The Journal of Immunology [Internet]. 2011 [citado 16 noviembre 2021]; 187 (1): 424-433. Disponible en: <https://www.jimmunol.org/content/187/1/424.full>

6. Barnett, C., Senapathi, T., Bray, S., Goué, N. Analysis of molecular dynamics simulations. Galaxy Training Materials [Internet]. 2022 [citado 8 agosto 2022]. Disponible en: <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/computational-chemistry/tutorials/analysis-md-simulations/tutorial.html>
7. Baum, D., Smith, S. Tree Thinking: An Introduction to Phylogenetic Biology. Nueva York, Estados Unidos: w. h. freeman Macmillan Learning; 2013.
8. Benvenuto, D., Giovanetti, M., Ciccozzi, A., Spoto, S., Ageletti, S., Ciccozzi, M. The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. Journal of Medical Virology [Internet]. 2020 [citado el 20 de septiembre de 2022]; 92 (4): 455-459. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7166400/>
9. Bolin, S. Bovine viral diarrhea virus in mixed infection. Polymicrobial Diseases. Washington D.C, Estados Unidos; ASM Press [Internet]. 2002 [citado el 30 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2491/>
10. Casciari, C., Sozzi, E., Bazzuchi, M., Moreno Martin, A., Gaffuri, A., Giammarioli, M., Lavazza, A., De Mia, G. Serological relationship between a novel ovine pestivirus and classical swine fever virus. Wiley [Internet]. 2020 [citado el 21 de septiembre de 2022]; 67 (3): 1406-1410. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.13480>
11. Chen, S., Wu, Z., Wang, M., Cheng, A. Innate Immune Evasion Mediated by *Flaviviridae* Non-Structural Proteins. Viruses [Internet]. 2017 [citado 18 noviembre 2021]; 9 (10): 291. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4915/9/10/291/htm>

12. Choi, K., Gallei, A., Becher, P., Rossmann, M. The Structure of Bovine Viral Diarrhea Virus RNA-Dependent RNA Polymerase and Its Amino-Terminal Domain. Cell Press [Internet]. 2006 [citado el 22 de julio de 2022]; 14 (7): 1107-1113. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212606002590>
13. Cuesta, I. ¿Qué es la bioinformática y qué aplicaciones tiene en biomedicina? Instituto de Salud Carlos III [Internet]. 2020 [citado el 8 de octubre de 2022]. Disponible en:  
<https://www.isciii.es/InformacionCiudadanos/DivulgacionCulturaCientifica/DivulgacionISCIII/Paginas/Divulgacion/Bioinformatica.aspx>
14. Denault, J.-B., Salvesen, G. S. Caspases: Current Protocols in Protein Science. Wiley [Internet]. 2001 [citado el 8 de agosto de 2022]; 26 (1): 1-16. Disponible en:  
<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471140864.ps2108s26>
15. Di Cera, E. Serine Proteases. IUBMB Journals [Internet]. 2009 [citado el 9 de agosto de 2022]; 61 (5): 510-515. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675663/>
16. EBML. What are protein domains? European Bioinformatics Institute [Internet]. 2022 [citado el 9 de agosto de 2022]. Disponible en:  
<https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/protein-classification-intro-ebi-resources/protein-classification/what-are-protein-domains/>
17. Edeling, M. A., Diamond, M. S., Fremont, D. H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]. 2014 [citado el 16 de marzo de 2023]; 111 (11). Disponible en:

<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1322036111#:~:text=The%20Flavivirus%20nonstructural%20protein%201,the%20plasma%20membrane%20of%20cells.>

18. Elinos-Báez, C.M., Maldonado, V., Meléndez-Zajgla, J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México* [Internet]. 2003 [citado 18 noviembre 2021]; 139 (5). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2003/gm035h.pdf>
19. Fielden, M., Matthews, J., Fertuck, K., Halgren, R., Zacharewski, T. *In Silico Approaches to Mechanistic and Predictive Toxicology: An Introduction to Bioinformatics for Toxicologists*. *Critical Reviews in Toxicology* [Internet]. 2002 [citado el 9 de agosto de 2022]; 32 (2): 67-112. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11951993/>
20. Gasteiger E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. Bairoch, A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server* [Internet]. John M. Walter Editorial; *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 2005 [citado el 17 de marzo de 2023].
21. Gómez, M., Alvarico, R., Valbuena, R., Aquino, A., Matira, A., Tayo, L. *In silico Protein Structure Comparison of Conotoxins with VI/VII Cysteine Framework*. *Proceedings of the 2019 3<sup>rd</sup> International Conference on Computational Biology and Bioinformatics* [Internet]. 2019 [citado el 21 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://dl.acm.org/doi/abs/10.1145/3365966.3365978>
22. Grüning, B., Dale, R., Sjödin, A., Chapman, B. A., Rowe, J., Tomkins. Tinch, C. H., Valieris, R. *Bioconda: Sustainable and Comprehensive Software Distribution for the Life Sciences* [Internet]. *Nature Methods*. 2018 [citado el 17 de marzo de 2023].

23. Helma, C. In silico Predictive Toxicology: The State of the Art and Strategies to Predict Human Health Effects. Institute of Computer Science Freiburg [Internet]. 2005 [citado el 9 de agosto de 2022]; 8 (1): 27-31. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15679168/>
24. ICTV. Genus: *Pegivirus* [Internet]. 2021 [citado 23 octubre 2021]. Disponible en: [https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/363/genus-pegivirus](https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/363/genus-pegivirus)
25. Kameyama, K., Sakoda, Y., Matsuno, K., Ito, A., Tajima, M., Nakamura, S., Kida, H. Cleavage of the NS2-3 protein in the cells of cattle persistently infected with non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. Microbiology and Immunology [Internet]. 2008 [citado del 22 de junio de 2022]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1348-0421.2008.00013.x>
26. Knipe, D., Howley, P. Fields Virology. Sexta edición. Philadelphia, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2013.
27. Morales-Aguilar, A., López-Reyes, Y., Regalado-Huitrón, M., Sarmiento-Silva, R., ArriagaPizano, L., Benítez-Guzmán, A. The NADL Strain of Bovine Viral Diarrhea Virus Induces The Secretion of IL-1B through Caspase 1 in Bovine Macrophages. Research in Veterinary Science [Internet]. 2020 [citado 23 octubre 2021]; 131 (131-136). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528819308240>
28. Lussi, C., de Martin, E., Schweizer, M. Positively Charged Amino Acids in the Pestiviral Erns Control Cell Entry, Endoribonuclease Activity and Innate

- Immune Evasion. *Viruses* [Internet]. 2021 [citado 23 noviembre 2021]; 13 (8): 1581. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/8/1581/htm>
29. Mani, S., Wah Tan, C., Wang, L., Anderson, D. Serological Cross Reactivity between Zika and Dengue Viruses in Experimentally Infected Monkeys. *Virologica Sinica* [Internet]. 2018 [citado el 21 de septiembre de 2022]; 33: 378-381. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12250-018-0048-8>
30. Mou, C., Pan, S., Wu, H., Chen, Z. Disruption of the interferon-  $\beta$  production by the Npro of atypical porcine *Pestivirus*. *Virulence* [Internet]. 2021 [citado 29 octubre 2021]; 12 (1): 654-665. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2021.1880773>
31. OIE. Bovine Viral Diarrhoea [Internet]. 2018 [citado el 30 de enero de 2023]. Disponible en: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.04.07\\_BVD.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf)
32. Okada, M., Tsukamoto, M., Ohwada, H., Aoki, S. Consensus Scoring to Improve the Predictive Power of In-Silico Screening for Drug Design. International Conference on Environmental Management and Engineering [Internet]. 2011 [citado el 9 de agosto de 2022]. Disponible en: [https://www.iis.org/CDs2011/CD2011IMC/ICEME\\_2011/PapersPdf/FB886EM.pdf](https://www.iis.org/CDs2011/CD2011IMC/ICEME_2011/PapersPdf/FB886EM.pdf)
33. Pan, Y. Cheng, A. Wang, M., Yin, Z., Jia, R. The Dual Regulation of Apoptosis by *Flavivirus*. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2021 [citado 29 de octubre 2021]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.654494/full>

34. Peterhans, E., Schweizer, M. BVDV: A *Pestivirus* inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals* [Internet]. 2013 [citado 22 noviembre 2021]; 41 (39-51). Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22871358/>
35. Pettersen, E. F., Goddard, T.D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis [Internet]. 2004 [citado el 17 de marzo de 2023]; 25 (13): 1605-1612.
36. Piplani, S., Singh, P., Winkler, D., Petrovsky, N. *In silico* comparison of SARS-CoV-2 spike protein-ACE2 binding affinities across species and implications for virus origin. *Scientific Reports* [Internet]. 2021 [citado el 21 de septiembre de 2022]; 11. Disponible en:  
<https://www.nature.com/articles/s41598-021-92388-5>
37. Ponce, D. Importancia de la bioinformática en tiempos de pandemia. BUAP [Internet]. 2022 [citado el 8 de octubre de 2022]. Disponible en:  
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/16297>
38. Porto-Espinoza, L., Cuadra-Sánchez, C., Moronta, R., Monsalve-Castillo, F., CallejasValero, D. Mecanismos de evasión inmunitaria del Virus de Hepatitis C. Revisión. *Investigación clínica* [Internet]. 2006 [citado 22 noviembre 2021]; 47 (1). Disponible en:  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0535-51332006000100008&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0535-51332006000100008&script=sci_arttext&tlng=en)
39. Protein [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (S), National Center for Biotechnology Information. 2004 [citado el 17 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

40. Rambaut, A. FigTree v1.3.1 [Internet]. Institute of Evolutionary Biology; University of Edinburgh, Edinburgh. 2010 [citado el 17 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figree>
41. Rathore, A., St. John., A. Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020 [citado el 21 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00334/full>
42. Rozewicki, Li, Amada, Standley, Katoh. MAFFT-DASH: Integrated protein sequence and structural alignments [Internet]. *Nucleic Acids Research*. 2019 [citado el 17 de marzo de 2023]; 47.
43. Sandle, T. *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control*. Woodhead Publishing [Internet]. 2016 [citado el 9 de agosto de 2022]; 131-145. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081000229000116>
44. Schweizer, M., Mätzener, P., Pfaffen, G., Stalder, H., Peterhans, E. “Self” and “Nonself” Manipulation of Interferon Defense during Persistent Infection: Bovine Viral Diarrhea Virus Resists Alpha/Beta Interferon without Blocking Antiviral Activity against Unrelated Viruses Replicating in Its Host Cells. *Journal of Virology* [Internet]. 2020 [citado 16 noviembre 2021]; 80 (14). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.02443-05>
45. Schweizer, M., Peterhans, E. Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits DoubleStranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis. *Journal of Virology* [Internet]. 2020 [citado 18 noviembre 2021]; 75 (10). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.75.10.4692-4698.2001>

46. Stamatakis, A. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies [Internet]. Bioinformatics. 2014 [citado el 17 de marzo de 2023].
47. Suzuki, Y., Gojobori, T. The Origin and Evolution of Ebola and Marburg Viruses. Molecular Biology and Evolution [Internet]. 1997 [citado el 20 de septiembre de 2022]; 14 (8): 800-806. Disponible en: <https://academic.oup.com/articule/14/8/800/982315>
48. Taschuk, F., Cherry, S. DEAD-Box Helicases: Sensors, Regulators, and Effectors for Antiviral Defense. Viruses [Internet]; 12 (2): 181; 2020 [citado el 9 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7077277/#:~:text=DEAD%2Dbox%20helicases%20are%20a,metabolism%20from%20biogenesis%20to%20decay.>
49. Tao, J., Liao, J., Wang, Y., Zhang, X., Wang, J., Zhu, G. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections in pigs. Veterinary Microbiology [Internet]. 2013 [citado el 6 de octubre de 2022]; 165 (3-4): 185-189. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23587625/>
50. Tautz, N., Kaiser, A., & Thiel, H.J. NS3 Serine Protease of Bovine Viral Diarrhea Virus: Characterization of Active Site Residues, NS4A Cofactor Domain, and Protease-Cofactor Interactions. Institut für Virologie [Internet]. 2000 [citado el 22 de junio de 2022]; 351-363. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10915606/>
51. Tautz, N., Thiel, H. Handbook of Proteolytic Enzymes. 3ra edición. A Elsevier; 2013 [citado el 15 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/B9780123822192006906?token=E>

[3F07B64BB6B273F123F2E508D47E41F8056BC5AD3800A4E090C09DF3A6EA7887FA6184D679F34E83FB75632C0A7FE42&originRegion=us-east-1&originCreation=20220601035926](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3F07B64BB6B273F123F2E508D47E41F8056BC5AD3800A4E090C09DF3A6EA7887FA6184D679F34E83FB75632C0A7FE42&originRegion=us-east-1&originCreation=20220601035926)

52. Tizard, I. *Veterinary Immunology*. 9na edición. Missouri, Estados Unidos: Elsevier; 2013.
53. Warrenner, P. Colleti, M. Pestivirus NS3 (p80) Protein Possesses RNA Helicase Activity. *Journal of Virology* [Internet]. 69 (3): 1720-1726. 1995 [citado el 22 de julio de 2022]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jvi.69.3.1720-1726.1995>
54. Waterhouse, A. M., Bertoni, M., Bienert, S. Studer, G., Tauriello, G., Gumienny R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [Internet]. *Nucleic Acids Res*. 2018 [Internet]; 46: 296-303.
55. Waterhouse, A. M., Procter J.B., Martin, D. M. A., Clamp, M., Barton, G. J. Jalview Version 2- A multiple sequence alignment editor and analysis workbench [Internet]. *Bioinformatics*. 2009 [citado el 17 de marzo de 2023]; 25: 1189-1191.
56. Yamane, D. Kato, K. Tohya, Y. Akashi, H. The double-stranded RNA-induced apoptosis pathway is involved in the cytopathogenicity of cytopathogenic Bovine viral diarrhea virus. *J Gen Virology* [Internet]. 87: 2961- 70 [citado el 13 de mayo de 2022]. Disponible en: [https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.81820-0#html\\_fulltext](https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.81820-0#html_fulltext)

57. Yu, Y. Wan, Z., Wang, J., Yang, X., Zhang, C. Review of human pegivirus: Prevalence, transmission, pathogenesis, and clinical implication. *Virulence* [Internet]. 13: 323-340. 2022 [citado el 27 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2022.2029328>

## ANEXO METODOLOGÍA

### Árboles filogenéticos

Fase 1: Instalación de programas.

1. Instalación de MiniConda:

```
conda install -c bioconda blast o conda install -c bioconda blast-legacy
```

2. Instalación MAFFT:

```
conda install -c bioconda mafft
```

3. Ambiente en python versión 2.7:

```
conda create -n py27 python=2.7 anaconda
```

```
source activate py27
```

4. Instalación BioPython:

```
conda install -c conda-forge biopython
```

5. Instalación extract align:

```
conda install -c bioconda emboss
```

6. Usar extract align:

```
extractalign -sequence alin_Trehalose2021.faa -regions 23-300, 305,350 -outseq
```

```
prueba_extractalign.faa
```

Fase 2: Crear el banco de secuencias y hacer el BLASTp.

1. Se generaron para cada proteína dos archivos, uno contiene la secuencia de la proteína correspondiente de la cepa NADL, y el segundo archivo son todas las proteínas descargadas desde NCBI:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?SeqType\\_s=Protein&utm\\_source=genome&utm\\_medium=referral&utm\\_campaign=KnownItemSensor:assemb](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?SeqType_s=Protein&utm_source=genome&utm_medium=referral&utm_campaign=KnownItemSensor:assemb)

2. Se corrieron los BLASTp (p- protein):

a) Formatear la base de datos con el programa "makeblastdb" (con el archivo de secuencias descargadas de NCBI para todos los genes:

```
makeblastdb -in capsid_ncbi.faa -out capsid_ncbi.faa -dbtype prot -parse_seqids
```

b) Correr BLAST:

-query = secuencia del gen de interés de la cepa NADL

-db = base de datos que se formateo en el paso a)

-out = resultado del blastp

El resultado esta en formato tabular:

Columna 1= Nombre del query; Columna2= ignorar; Columna3=Nombre de la secuencia con quien hubo match; Columna4= Longitud de la secuencia; Columna5= Porcentaje de identidad; Columna6= Cobertura de alineamiento; Columna7=evaluate; Columna8=bitscore

```
blastp -query capsid_bvdv.faa -db capsid_ncbi.faa -out capsid.blastout -outfmt '6 qseqid qgi  
sseqid length pident qcovs evaluate bitscore' -num_threads 6
```

Nota: Se pueden aplicar filtros en el resultado de BLASTp, como de evaluate y/o porcentaje de identidad. Si queremos filtrar aquellos match que tuvieron un porcentaje de identidad mayor e igual a 70, con un evaluate menor o igual a 0:

```
awk '{if($5>=70 && $8<=0) print$0}' capsid.blastout
```

Fase 3: Extracción de secuencias, alineamiento y filtros.

1. Extraer las secuencias con quien hubo match, a partir de los nombres de la secuencia utilizando la Columna3.
2. Generar una lista con los nombres (id) de las secuencias que queremos extraer y guardarlas en un archivo. Por ejemplo, utilizando la salida de blast.

Apartir de la tercer columna del resultado blastp, generar la lista de esas secuencias que hicieron match. La lista va a estar en un archivo que se llama "lista\_seq"

```
awk '{print$3}' capsid.blastout | awk -F"|" '{print$2}' > lista_seq
```

3. Utilizando esa lista de secuencias y con un archivo extract\_seq.py se genera un archivo con las secuencias completas del alineamiento con el nombre "output.fasta" que puede ser sustituido por "secuencias.faa":

```
chmod +x extract_seq.py
```

```
python extract_seq.py capsid.fasta lista_seq
```

4. Hacer un archivo que contenga todas las secuencias para cada proteína. Las secuencias extraídas tienen el sufijo "secuencia.faa".
5. Realizar el alineamiento, se utilizó MAFFT, el resultado de los alineamientos tiene el prefijo "align".

```
mafft --anysymbol --parttree --retree 1 capsid_secuencias.faa > align_capsid.faa
```

6. Visualizar el alineamiento, se utilizó JalView, abriendo el align y se pueden usar diferentes colores para poder visualizarlo mejor, por porcentaje de identidad o por color Taylor. También es posible visualizar ahí el porcentaje de identidad, en caso de que salga extraño se puede usar NEEDLE o MUSCLE. El porcentaje de identidad también se puede observar en el BLASTp.

Para filtrar las secuencias por largo para posteriormente extraer la secuencia (puntos 3 a 5):

```
awk '/^>/ {if (seqlen) print seqlen;print;seqlen=0;next} {seqlen+=length($0)}END{print seqlen}' NOMBREDEARCHIVO > Calcular_longitud.txt
```

o

`Grep ">" Calcular_longitud.txt` (Ahí sale solo los nombres de las secuencias)

o

`Grep -v ">" Calcular_longitud.txt` (Ahí sale solo la longitud de las secuencias)

Fase 4: Árbol filogenético:

1. Instalación RAxML:

`conda install -c bioconda raxml`

2. Realización del árbol filogenético:

`raxmlHPC-PTHREADS -f a -p 12345 -m PROTCATJTT -s align_capsid.fasta -n  
alineamientoCapsid.tree -# 10000 -T 2 -x 500`

Se cambian los números que van después de `-#`, esos son el número de repeticiones que se hará del árbol, después de `-x` va cada cuantos árboles se hará un árbol consenso. PROTCATJTT significa PROT de proteína, JTT es el modelo evolutivo que se usará para el árbol filogenético.

3. Instalación de FigTree para la visualización:

`conda install -c bioconda figtree`

4. Usando el comando "FigTree" se abre el programa para visualizar el árbol:

`Figtree`

Cuadro 5. Secuencias utilizadas.

Proteína	Secuencia	Virus
Npro	NP_776259.1	Diarrea viral bovina 1
Npro	NP_777494.1	Fiebre porcina clásica
Npro	NP_777533.1	Enfermedad de las fronteras
Npro	AEW50182.1	Dengue 4
Capsid	NP_776260.1	Diarrea viral bovina 1
Capsid	ARK38541.1	Diarrea viral bovina 3
Capsid	NP_777495.1	Fiebre porcina clásica
Capsid	NP_777534.1	Enfermedad de las fronteras
Capsid	ABV54625.1	Pestivirus ovino
E1	NP_776262.1	Diarrea viral bovina 1
E1	QCB65264.1	Atypical porcine pestivirus
E1	ARK38541.1	Diarrea viral bovina 3
E1	AVA30713.1	Diarrea viral bovina 2
E1	ATN39078.1	Diarrea viral bovina 1b
E1	NP_777497.1	Fiebre porcina clásica
E1	NP_777536.1	Enfermedad de las fronteras
E1	AAW88355.1	Diarrea viral bovina 1 Ind S1226
E1	AAR83680.1	Tunisian sheep virus
E1	AAK56854.1	Diarrea viral bovina Braidwood
E1	AAC06278.2	Diarrea viral bovina Bega
E1	AAC06279.2	Diarrea viral bovina Trangie Y546
E2	NP_776263.1	Diarrea viral bovina 1
E2	NP_777498.1	Fiebre porcina clásica
E2	NP_777537.1	Enfermedad de las fronteras
Erns	NP_776262.1	Diarrea viral bovina 1
p7	NP_776265.1	Diarrea viral bovina 1
p7	NP_777500.1	Fiebre porcina clásica
p7	NP_777539.1	Enfermedad de las fronteras
p7	YP_009506362.1	Hepacivirus M
p7	YP_009325330.1	Bat hepacivirus
p7	AAD41725.1	Diarrea viral bovina 2
NS2-3	NP_776266.1	Diarrea viral bovina 1
NS2-3	NP_777501.1	Fiebre porcina clásica
NS2-3	NP_777540.1	Enfermedad de las fronteras

Cuadro 5. Secuencias utilizadas (continuación).

Proteína	Secuencia	Virus
NS3	NP_776267.1	Diarrea viral bovina 1
NS3	AAB04812.1	GB virus C
NS3	NP_777502.1	Fiebre porcina clásica
NS3	AAP78942.1	Kunjin virus
NS3	AAK67712.1	Dengue 2
NS3	ARB07984.1	Zika
NS3	NP_776018.1	West Nile virus
NS3	NP_775670.1	Japanese encephalitis virus
NS3	ACX42224.2	Diarrea viral bovina 2
NS3	AAM91913.1	Diarrea viral bovina 2-New York '93
NS3	YP_009179227.1	Wenling shark virus
NS3	NP_056931.1	Hepatitis GB virus B
NS3	YP_007697649.1	Equine pegivirus 1
NS3	YP_001008348.1	Saint Louis encephalitis
NS3	AMK47901.1	Culex flavivirus
NS3	YP_009164031.1	Mercadeo virus
NS3	YP_009259489.1	Hanko virus
NS3	AAC77906.1	Diarrea viral bovina Rit 4350
NS3	AKT04586.1	Hepacivirus C
NS3	AHG23200.1	Dengue 1
NS3	AEV46286.1	Hepacivirus C 3
NS3	AYP74868.1	Quang Binh virus
NS3	YP_009553010.1	Culex theileri flavivirus
NS3	YP_009352228.1	Ochlerotatus caspius flavivirus
NS3	YP_007877501.1	Mosquito flavivirus
NS3	NP_658908.1	Tamana bat virus
NS3	YP_009256193.1	Culiseta flavivirus
NS3	AWF71072.1	Fiebre amarilla
NS3	ACV04605.2	Nakiwogo virus
NS3	YP_009344962.1	Palm Creek virus
NS3	YP_009389296.1	Mac Peak virus
NS3	ATL63282.1	La Tina virus
NS3	ATN29922.1	Long Pine Key virus
NS3	ASD50161.1	Haslams Creek virus
NS3	ASD50159.1	Karumba virus
NS3	ABL64013.1	Hepacivirus C
ns3	NP_777541.1	Border disease virus
NS4a	NP_776268.1	Diarrea viral bovina 1
NS4a	NP_777503.1	Fiebre porcina clásica
NS4a	NP_777542.1	Enfermedad de las fronteras

Cuadro 5. Secuencias utilizadas (continuación).

Proteína	Secuencia	Virus
NS4b	NP_776269.1	Diarrea viral bovina 1
NS4b	NP_777504.1	Fiebre porcina clásica
NS4b	NP_777543.1	Enfermedad de las fronteras
NS4b	AAF73908.1	Diarrea viral bovina 1-CP821
NS4b	AAF73910.1	Diarrea viral bovina 1-NCP821
NS5a	NP_776270.1	Diarrea viral bovina 1
NS5a	NP_777505.1	Fiebre porcina clásica
NS5a	NP_777544.1	Enfermedad de las fronteras
NS5a	NP_056931.1	Hepatitis GB virus B
NS5a	NP_042692.1	Hepacivirus B
NS5a	YP_009506359.1	Hepacivirus I
NS5a	ADH82350.1	Hepatitis C 1a
NS5a	AMK92549.1	Hepacivirus C- modelo
NS5a	AMK92547.1	Hepacivirus C
NS5a	AAF73910.1	Diarrea viral bovina 1-NCP821
NS5b	NP_776271.1	Diarrea viral bovina 1
NS5b	NP_777506.1	Fiebre porcina clásica
NS5b	NP_777545.1	Enfermedad de las fronteras

Cuadro 5. Secuencias utilizadas. Columna 1: Proteína de la cuál se tiene la secuencia. Columna 2: Número de acceso de la secuencia utilizada. Columna 3. Virus del cuál es la secuencia utilizada.

## Modelos proteicos

Fase 1: Obtención los modelos proteicos.

1. Obtener las secuencias alineadas, los fragmentos que se alinearon con la proteína de nuestro interés (los fragmentos lo puedes obtener con extract align).
2. Introducir la secuencia en <https://swissmodel.expasy.org/interactive> se selecciona la del mayor Seq Identity y menor QMEANDisCo.
3. Descargar en formato pmb.
4. Visualizar en chimera.
5. Minimizar la energía (tools → structure editing → minimize energy).

## Fase 2: Comparaciones proteicas.

1. Una vez que ya minimizamos la energía, se abren las dos proteínas a comparar en chimera.
2. MatchMaker (Tools → sequence comparison → MatchMacker).
3. Seleccionamos como secuencia principal BVDV y la otra como la que compararemos.
4. Obtenemos el dato RMSD y guardamos la session.

## Fase 3: Comparaciones de los dominios proteicos.

1. En NCBI obtenemos las secuencias para nuestras proteínas.
2. Abrimos chimera y después de realizar el MatchMaker seleccionamos la opción Match Align.
3. En Match Align buscamos la secuencia del dominio de nuestra proteína de interés, la seleccionamos.
4. Nos arroja el RMSD además de mostrar en el modelo la parte seleccionada.

Cuadro 6. Templados utilizados.

Proteína	Virus	Templados
Npro	Diarrea viral bovina 1	4h9k.1.A
Npro	Fiebre porcina clásica	4h9k.1.A
Npro	Enfermedad de las fronteras	4h9k.1.A
Npro	Dengue 4	5u4w.1.B
Capsid	Diarrea viral bovina 1	2lft.1.A
Capsid	Diarrea viral bovina 3	2l9h.1.A
Capsid	Fiebre porcina clásica	2l9h.1.A
Capsid	Enfermedad de las fronteras	2lsb.1.A
Capsid	Pestivirus ovino	x
E1	Diarrea viral bovina 1	7jhy.1.H
E1	Atypical porcine pestivirus	1wij.1.A
E1	Diarrea viral bovina 3	7jhy.1.H
E1	Diarrea viral bovina 2	7jhy.1.H
E1	Diarrea viral bovina 1b	7jhy.1.H
E1	Fiebre porcina clásica	7jhy.1.H
E1	Enfermedad de las fronteras	7jhy.1.H
E1	Diarrea viral bovina 1 Ind S122	7jhy.1.H
E1	Tunisian sheep virus	7jhy.1.H
E1	Diarrea viral bovina Braidwood	7jhy.1.H
E1	Diarrea viral bovina Bega	7jhy.1.H
E1	Diarrea viral bovina Trangie Y!	7jhy.1.H
E2	Diarrea viral bovina 1	2yq2.1.A
E2	Fiebre porcina clásica	4jnt.1.A
E2	Enfermedad de las fronteras	2yq2.1.A
Erns	Diarrea viral bovina 1	7jhy.1.H
p7	Diarrea viral bovina 1	x
p7	Fiebre porcina clásica	x
p7	Enfermedad de las fronteras	5z07.1.A
p7	Hepacivirus M	x
p7	Bat hepacivirus	x
p7	Diarrea viral bovina 2	4h9k.1.A
NS2-3	Diarrea viral bovina 1	5wx1.1.A
NS2-3	Fiebre porcina clásica	5wx1.1.A
NS2-3	Enfermedad de las fronteras	5wx1.1.A

Cuadro 6. Templados utilizados (continuación).

<b>Proteína</b>	<b>Virus</b>	<b>Templados</b>
NS3	Diarrea viral bovina 1	5wx1.1.A
NS3	GB virus C	4wxp.1.A
NS3	Fiebre porcina clásica	5wx1.1.A
NS3	Kunjin virus	5idk.3.A
NS3	Dengue 2	5yw1.1.A
NS3	Zika	2whx.1.A
NS3	West Nile virus	2wv9.1.A
NS3	Japanese encephalitis virus	2wv9.1.A
NS3	Diarrea viral bovina 2	5wx1.1.A
NS3	Diarrea viral bovina 2-New Yo	5wx1.1.A
NS3	Wenling shark virus	3o8c.1.A
NS3	Hepatitis GB virus B	3o8d.1.A
NS3	Equine pegivirus 1	4a92.1.A
NS3	Saint Louis encephalitis	2wv9.1.A
NS3	Culex flavivirus	2wv9.1.A
NS3	Mercadeo virus	2wv9.1.A
NS3	Hanko virus	2whx.1.A
NS3	Diarrea viral bovina Rit 4350	5wx1.1.A
NS3	Dengue 1	2jls.1.A
NS3	Hepacivirus C 3	5wdx.1.A
NS3	Quang Binh virus	2whx.1.A
NS3	Culex theileri flavivirus	2wv9.1.A
NS3	Ochlerotatus caspius flavivirus	2wv9.1.A
NS3	Mosquito flavivirus	2whx.1.A
NS3	Tamana bat virus	2whx.1.A
NS3	Culiseta flavivirus	2whx.1.A
NS3	Fiebre amarilla	1yks.1.A
NS3	Nakiwogo virus	5yw1.1.A
NS3	Palm Creek virus	5yw1.1.A
NS3	Mac Peak virus	2whx.1.A
NS3	La Tina virus	5yw1.1.A
NS3	Long Pine Key virus	2wv9.1.A
NS3	Haslams Creek virus	2whx.1.A
NS3	Karumba virus	2whx.1.A
NS3	Hepacivirus C	1cu1.1.A
NS3	Enfermedad de las fronteras	5wx1.1.A
NS4a	Diarrea viral bovina 1	5mz4.1.A
NS4a	Fiebre porcina clásica	5mz4.1.A
NS4a	Enfermedad de las fronteras	5mz4.1.A

Cuadro 6. Templados utilizados (continuación).

Proteína	Virus	Templados
NS4b	Diarrea viral bovina 1	5mz4.1.A
NS4b	Fiebre porcina clásica	5mz4.1.A
NS4b	Enfermedad de las fronteras	5mz4.1.A
NS4b	Diarrea viral bovina 1-CP821	5mz4.1.A
NS4b	Diarrea viral bovina 1-NCP821	5mz4.1.A
NS5a	Diarrea viral bovina 1	2ajm.1
NS5a	Fiebre porcina clásica	2ajm.1
NS5a	Enfermedad de las fronteras	2ajm.1
NS5a	Hepatitis GB virus B	3ske.1.A
NS5a	Hepacivirus B	4khn.1.A
NS5a	Hepacivirus I	4adp.1.A
NS5a	Hepatitis C 1a	2ajm.1
NS5a	Hepacivirus C	2ajm.1
NS5a	Diarrea viral bovina 1-NCP821	2ajm.1
NS5b	Diarrea viral bovina 1	1s48.1.A
NS5b	Fiebre porcina clásica	5yf6.1.A
NS5b	Enfermedad de las fronteras	5yf6.1.A

Cuadro 6. Templados utilizados. La columna “Proteína” señala la proteína que se modeló. La columna “Virus” es el virus del cuál se modeló” y la columna “Templados” señala el número de acceso para el templatado utilizado para la construcción por homología de la proteína.

## Predicción de escisiones por caspasa-1

1. Utilizando las secuencias de los árboles (Cuadro 5) se realizó el análisis de la predicción de caspasas en la herramienta en línea Peptide Cutter de ExPASy by SwissModel: [https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)
2. Se copiaron y pegaron las secuencias una por una.
3. Se selecciona la opción “Only the following selection of enzymes and chemicals” marcando Caspase1 para posteriormente comenzar el experimento con “Perform”.
4. Se procede a la lectura del experimento.