



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Interacción de los macrófagos bovinos con el Virus de la Diarrea
Viral Bovina**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área Química Biológica
Lic. Lucas José Barone

Directora de tesis: Dra. Alejandra Victoria Capozzo
Directora adjunta: Dra. Nancy Patricia Cardoso
Consejera de estudios: Dra. Viviana Castilla

Lugar de trabajo:

Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT) – Centro de Investigaciones en
Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) – Centro Nacional de Investigaciones
Agropecuarias (CNIA) – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

Buenos Aires, 2022

Interacción de los macrófagos bovinos con el Virus de la Diarrea Viral Bovina

RESUMEN

La infección de células del sistema inmune por el Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) tiene un efecto profundo en su actividad, ya sea desencadenando muerte celular masiva o afectando su funcionalidad. En este estudio caracterizamos la interacción entre el BVDV y los macrófagos bovinos (M ϕ). Identificamos que una cepa de campo argentina no citopática del genotipo 2 (BVDV 98-124) presentaba un tropismo preferencial por las células presentadoras de antígenos, siendo el linaje monocítico la población más infectada. Este virus infectó y replicó eficientemente *in vitro* en M ϕ CD14+ derivados de monocitos (M ϕ -Mo) utilizando un mecanismo de entrada mediado por la glicoproteína E2 de la envoltura viral. La replicación del BVDV 98-124 fue mayor en M ϕ -Mo antiinflamatorios diferenciados *in vitro* "M2" que en su contraparte proinflamatoria "M1", mientras que el tratamiento con IFN- α impidió la replicación. La infección promovió un perfil antiinflamatorio en los M ϕ -Mo al regular negativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias y promover la expresión de IL-10. Extendiendo el estudio con cepas del BVDV de diferente genotipo y biotipo, verificamos niveles de replicación viral más altos en M ϕ -Mo productores de arginasa (marcador M2), constatándose una asociación significativa entre la actividad arginasa y la tasa de replicación viral. El tratamiento de terneros con compuestos pro o anti-inflamatorios también reveló la asociación positiva entre la actividad arginasa de M ϕ -Mo y la replicación del BVDV. Comprobamos además que los M ϕ -Mo provenientes de vacas preñadas y terneros presentaron una actividad arginasa mayor que la determinada en animales adultos. Nuestros resultados demuestran un tropismo preferencial del BVDV por M ϕ activados alternativamente y la capacidad del virus de promover en estas células el perfil M2 favorable a la infección. Además sugieren que el estado inmunitario del animal en el momento de la infección (es decir, si el animal se encuentra atravesando una infección viral, luego de la vacunación, en tratamiento con antibióticos, o en la juventud o la preñez, entre otros) sería fundamental para definir la fisiopatología de la enfermedad. Comprender el impacto del fenotipo de los M ϕ en la infección por el BVDV puede revelar un posible rol de estas células en el establecimiento de la inmunosupresión causada por este virus en los bovinos.

Palabras clave: BVDV, macrófagos polarizados, inmunomodulación, arginasa, tropismo.

Interaction of bovine macrophages with Bovine Viral Diarrhea Virus

ABSTRACT

Infection of immune cells by Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) has a profound effect on their activity, by either triggering massive cell death or affecting their functionality. This study characterized the interaction between BVDV and bovine macrophages (M ϕ). We first identified a preferential tropism of an Argentinean type-2 non-cytopathic field strain (BVDV 98-124) for antigen-presenting cells, being cells of monocyte lineage the most infected population. BVDV 98-124 efficiently infected and replicated in CD14+ M ϕ *in-vitro* differentiated from monocytes (Mo-M ϕ) by an envelope E2 glycoprotein-mediated viral entrance mechanism. Higher viral replication levels were observed in *in-vitro* differentiated anti-inflammatory (M2) Mo-M ϕ than in their M1-counterparts, while IFN- α treatment prevented BVDV replication. Infection promoted an anti-inflammatory profile in Mo-M ϕ by downregulating proinflammatory cytokines expression and upregulating IL-10. Higher replication levels in arginase-producing Mo-M ϕ (an M2 marker) were verified with BVDV strains of different genotypes and biotypes, confirming a significant association between arginase activity and the viral replication rate. Inoculation of calves with M1 and M2 M ϕ -type promoting compounds also revealed a positive association between arginase activity of Mo-M ϕ and BVDV replication. Interestingly, Mo-M ϕ from pregnant dams and calves produced higher arginase levels than those measured in adult animals. Our results demonstrate that BVDV has a preferential tropism for alternatively activated Mo-M ϕ and can modulate these cells towards the most permissive phenotype. They also suggest that the immune status of the animal at the time of infection (i.e. undergoing another viral infection, after vaccination, antibiotic treatment, young age, or pregnancy) can be paramount to defining the physiopathology of the disease. Understanding the impact of the M ϕ phenotype in BVDV infection may unveil a possible leading role of these cells in establishing the observed immune-suppressive state in bovines.

Key words: BVDV, polarized macrophages, immunomodulation, arginase, tropism.

Agradecimientos

Este trabajo de tesis ha sido posible gracias al concurso de muchos hechos, instituciones y personas con los que estaré agradecido por siempre.

En orden de aparición:

A mi vieja, por su apoyo incondicional siempre. A mi viejo, por inculcarme casi sin saberlo, el amor por la ciencia.

A mi hermano, y a los hermanos de la vida que me acompañan desde la infancia.

A ese fenómeno increíble que es la Universidad de Buenos Aires, por formar personas altamente calificadas, con una educación pública, gratuita y de calidad, en un país con muchísimos problemas. A la Universidad de Granada por formarme, mis más hermosos recuerdos están allá.

A Mary por su apoyo incondicional y por ser parte de mi hermosa familia y a mi bomboncito Laila, que nació con esta tesis, me acompañó al trabajo todos los días por tres años y tuvo que soportar quedarse en el lab después de hora trabajando y que papá tenga poco tiempo para jugar con ella. Son mis pilares, los amo.

A la ANPCyT y a CONICET por brindar los recursos económicos necesarios para la realización de esta tesis.

A INTA y al IVIT por brindar mucho más que la infraestructura necesaria para la realización del trabajo de laboratorio. A las personas que conocí adentro, los becarios y profesionales que generan un buen clima de trabajo y cordialidad cotidiano. A aquellos que hicieron contribuciones pequeñas pero significativas, de manera desinteresada, Ivana Soria, Juan Pablo Jaworsky, Fede Blanco, Gaby López, Diego González, Esteban Turic, Claudio Paolazzi y seguramente estoy siendo injusto por no mencionar a todos.

A Cultivos celulares del IVIT, especialmente a Diego Compared por su servicio continuo de medios y cultivos.

A la gente del Campo Experimental, Claudio, Roberto, Gastón, Vero y especialmente a Diego Franco, por permitirme muestrear muchísimas veces, incluso días fuera de lo previsto, siempre con la mejor disposición para el trabajo.

Al grupo de trabajo que pertenezco, mis compañeras y compañeros que aportaron ayuda, buena onda y conocimientos para todo lo que necesité a lo largo de estos años: l@s que se fueron, Maru, Ceci, Rodri y Belén y l@s que quedaron Juan, Flor y Marian. Flor y Marian me ayudaron muchísimo en la recta final. A los chicos y chicas del F, Digi, Danilo, Juan, Flor, Cruz y Andre, que aportaron toda la colaboración posible y la mejor onda siempre. A Mariano Pérez, por dirigir un grupo humano y profesional excepcional.

A Nancy Cardoso, por su infinita paciencia, por ayudar siempre y contribuir de manera significativa en mi formación.

A Ale Capozzo, por darme la oportunidad en un contexto difícil, por apoyarme siempre, por mirar el lado humano y dirigirme además de fomentar mis propios criterios e ideas.

A todos ellos y ellas ¡GRACIAS TOTALES!

Tabla de contenidos

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
Agradecimientos	5
Tabla de contenidos	7
Abreviaturas utilizadas	13
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Agente etiológico	17
1.2. Morfología viral	17
1.2.1. Proteínas estructurales y envoltura viral	17
1.2.2. Genoma viral	18
1.2.3. Proteínas no estructurales	19
1.3. Genotipos y biotipos virales	21
1.4. Ciclo viral	22
1.4.1. Adsorción e internalización	22
1.4.2. Replicación y liberación.....	24
1.5. Epidemiología del BVDV	27
1.5.1. Transmisión horizontal y vertical	27
1.5.2. Infección aguda	28
1.5.3. Infección persistente	29
1.5.4. Enfermedad de las mucosas.....	30
1.6. Proteínas antigénicas del BVDV	30
1.7. Diagnóstico	31
1.8. Situación global del BVDV	32
1.8.1. Impacto económico.....	34
1.8.2. Situación de la enfermedad en Argentina.....	34
1.9. Inmunopatogenia	35
1.9.1. Inducción de apoptosis e IFNs.....	36
1.9.2. Inmunopatogenia de la Infección persistente.....	37
1.9.3. BVDV y células inmunes bovinas.....	39
1.9.3.1. Células presentadoras de antígeno	39
1.9.3.2. Células T	40
1.9.3.3. Células B y anticuerpos	41

1.10.	Los macrófagos	42
1.10.1.	Perfiles de macrófagos	43
1.10.2.	Macrófagos y su implicancia en la inmunopatogenia	45
1.10.3.	Macrófagos e infecciones virales	47
1.10.3.1.	Mecanismos de entrada de los virus a los Macrófagos	48
1.10.3.2.	Modulación de los macrófagos promovidas por infecciones virales	49
1.10.3.3.	Macrófagos durante la preñez y el periodo neonatal	51
1.10.4.	Macrófagos bovinos	52
1.10.4.1.	Antecedentes de estudio de BVDV en Macrófagos	54
1.10.4.1.1.	Experimentos <i>ex vivo</i>	54
1.10.4.1.2.	Experimentos <i>in vivo</i>	55
1.11.	Hipótesis	56
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	58
2.1.	Virus	58
2.2.	Animales	58
2.3.	Células	59
2.3.1.	Cultivos de líneas celulares y medios de cultivo	59
2.3.1.1.	Producción de bancos celulares	60
2.3.2.	Cultivos celulares primarios	61
2.3.2.1.	Obtención de células mononucleares de sangre periférica bovinas	61
2.3.2.2.	Obtención de macrófagos derivados de monocitos bovinos	61
2.3.2.2.1.	Purificación de células CD14+ por tecnología MACS	62
2.3.2.2.2.	Purificación de células CD14+ por adherencia diferencial en placa de cultivo	63
2.3.2.2.3.	Polarización de macrófagos derivados de monocitos bovinos	63
2.3.2.3.	Purificación de macrófagos peritoneales murinos	64
2.4.	Técnicas de virología y diagnóstico	64
2.4.1.	Producción de banco de virus	64
2.4.2.	Inactivación de virus.....	65
2.4.3.	Infecciones virales	65
2.4.4.	Cinética de replicación viral de un ciclo	65
2.4.5.	Determinación de la proteína no estructural 3 de BVDV.....	65
2.4.6.	Ensayo de microtitulación.....	66
2.4.7.	Cuantificación de partículas virales por RT-qPCR.....	67

2.4.7.1. Extracción de ARN	67
2.4.7.2. RT-PCR	67
2.4.7.3. RT-qPCR	67
2.4.8. Diagnóstico de BVDV por RT-PCR anidada	68
2.4.9. ELISA en células	69
2.5. Ensayos de viabilidad celular y toxicidad de compuestos	69
2.5.1. Ensayo de metabolización del XTT	70
2.5.2. Ensayo de viabilidad por integridad de membranas.....	70
2.5.3. Viabilidad celular por tinción con cristal violeta	70
2.6. Expresión de citoquinas	71
2.6.1. Expresión de citoquinas por RT-qPCR	71
2.6.2. ELISAs para la cuantificación de citoquinas	72
2.6.3. Determinación de IFN-I e IFN-III bovinos	73
2.7. Ensayos de citometría de flujo	74
2.7.1. Tropismo del BVDV en células mononucleares de sangre periférica.....	74
2.7.2. Caracterización de marcadores de superficie en macrófagos perfilados	75
2.8. Producción de E2 recombinante	76
2.8.1. Amplificación de baculovirus recombinante.....	77
2.8.2. Titulación del baculovirus recombinante.....	77
2.8.3. Infección de células SF9-BIR y producción de la proteína.....	77
2.8.4. Detección de E2 recombinante por Western Blot	78
2.8.5. Cuantificación de E2 recombinante por <i>in house</i> ELISA.....	78
2.8.6. Actividad biológica de E2 recombinante por inhibición de efecto citopático	79
2.9. Entrada del BVDV en macrófagos	80
2.10. Producción de IFN-I e IFN-III recombinantes	81
2.11. Actividad fagocítica en macrófagos derivados de monocitos perfilados	81
2.12. Actividad arginasa	83
2.13. Determinación de óxido nítrico	83
2.14. Ensayos de actividad biológica de la azitromicina	84
2.14.1. Actividad antibacteriana de azitromicina.....	84
2.14.2. Actividad antiviral y toxicidad de azitromicina	84
2.15. Ensayo de infectividad de múltiples cepas	85
2.16. Actividad arginasa y producción de IFNs en macrófagos derivados de monocitos provenientes de animales de distinto status fisiológico	86

2.17.	Experimentos <i>in vivo</i>	86
2.17.1.	Modelo murino	86
2.17.2.	Modelo bovino	87
2.18.	Estadística	89
3.	RESULTADOS	91
Capítulo 1 - Interacción del BVDV con células inmunes bovinas		91
Objetivos		91
Introducción		91
3.1.	Resultados	91
3.1.1.	Replicación del BVDV en células mononucleares de sangre periférica	91
3.1.2.	Expresión de citoquinas	92
3.1.3.	Viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica infectadas con el BVDV	93
3.1.4.	Puesta a punto de la marcación intracelular del BVDV en células mononucleares de sangre periférica.....	95
3.1.5.	Tropismo del BVDV en células mononucleares de sangre periférica.....	97
3.1.6.	Conclusiones parciales	99
Capítulo 2 - Interacción del BVDV con los macrófagos bovinos		100
Objetivos		100
Introducción		100
3.2.	Resultados	100
3.2.1.	Purificación de Monocitos.....	100
3.2.2.	Cinética de replicación del BVDV en macrófagos bovinos	101
3.2.3.	Evaluación del rol de la glicoproteína E2 de la envoltura viral en mediar la entrada del virus a los macrófagos	102
3.2.3.1.	Producción de la glicoproteína recombinante E2 de BVDV	102
3.2.3.2.	Actividad biológica de E2 recombinante: ensayos de inhibición competitiva	102
3.2.3.3.	Entrada del BVDV sobre los macrófagos derivados de monocitos	103
3.2.4.	Conclusiones parciales	106
Capítulo 3 - Interacción del BVDV con macrófagos derivados de monocitos perfilados		107
Objetivos		107
Introducción		107
3.3.	Resultados	107
3.3.1.	Caracterización de macrófagos derivados de monocitos perfilados <i>ex vivo</i>	107

3.3.1.1.	Producción de citoquinas, IFNs y actividad arginasa en macrófagos derivados de monocitos perfilados	107
3.3.1.2.	Caracterización de marcadores de superficie en macrófagos derivados de monocitos	109
3.3.1.3.	Actividad fagocítica de macrófagos derivados de monocitos perfilados	110
3.3.2.	Cinética de replicación del BVDV en un ciclo en macrófagos derivados de monocitos perfilados y producción de citoquinas inducidas por la infección	111
3.3.3.	Fagocitosis en macrófagos derivados de monocitos perfilados e infectados con el BVDV	113
3.3.4.	Caracterización de marcadores de superficie en macrófagos derivados de monocitos perfilados e infectados con el BVDV	113
3.3.5.	Actividad biológica y seguridad en el uso de azitromicina.....	114
3.3.6.	Actividad arginasa, replicación y viabilidad en macrófagos derivados de monocitos adherentes perfilados e infectados con cepas del BVDV de diferente biotipo y genotipo	115
3.3.6.1.	Actividad arginasa	116
3.3.6.2.	Viabilidad	116
3.3.6.3.	Replicación	119
3.3.6.4.	Relación entre la actividad arginasa y la replicación viral	120
3.3.7.	Actividad arginasa en macrófagos derivados de monocitos MACS o adherentes	122
3.3.8.	Actividad arginasa y producción de óxido nítrico e IFNs de macrófagos derivados de monocitos provenientes de animales con distinto status fisiológico	123
3.3.9.	Entrada del virus en macrófagos derivados de monocitos perfilados.....	124
3.3.10.	Conclusiones parciales	128
Capítulo 4 - Estudios <i>in vivo</i>		129
Objetivos		129
Introducción		129
3.4.	Resultados	129
3.4.1.	Experimento en ratones.....	129
3.4.1.1.	Resultados	131
3.4.2.	Experimento en bovinos	132
3.4.2.1.	Seguridad de los tratamientos aplicados	133
3.4.2.2.	Actividad arginasa, expresión de citoquinas y replicación viral en células inmunes	134
3.4.3.	Conclusiones parciales	140
4.	DISCUSIÓN	141

4.1.	Capítulo 1 - Interacción del BVDV con células inmunes bovinas	141
4.2.	Capítulo 2 - Interacción del BVDV con los macrófagos bovinos	144
4.3.	Capítulo 3 - Interacción del BVDV con macrófagos derivados de monocitos perfilados	147
4.4.	Capítulo 4 - Experimentos <i>in vivo</i>	155
5.	CONCLUSIONES FINALES	161
	BIBLIOGRAFÍA	163

Abreviaturas utilizadas

aa	Aminoácidos
ABC	Área bajo la curva
ABH	Clorhidrato de 6-borono-L-norleucina, clorhidrato de ácido 2(S)-amino-6-borono-hexanoico
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) diamonio
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNcd	ARN de cadena doble
ARNcs	ARN de cadena sencilla
ARNm	ARN mensajero
ATCC	<i>American Type Cell Collection</i>
BAL	Linfocitos broncoalveolares
BAP	Péptido aceptor de biotina
BD	Bilirrubinemia directa
BDV	Virus de la Enfermedad de las Fronteras
BLV	Virus de Leucosis Bovina
BT	Bilirrubinemia total
BVDV	Virus de la Diarrea Viral Bovina
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
CC	Control de células
CD	Célula dendrítica
CD-Mo	CD derivadas de monocitos
CGM	Células gigantes multinucleadas
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CI50 %	Concentración inhibitoria del 50 %
CICUAE	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
CICVyA	Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CMV	Citomegalovirus
CNIA	Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias
COL	Colesterol
ConA	Concavalina A
cp	Citopático
CPA	Células presentadoras de antígenos
CPP	Módulos de proteína de control de complemento
CRIB	Células resistentes a la infección con el BVDV
CSFV	Virus de la Fiebre Porcina Clásica
CT	Ciclo umbral
CV	Control de virus
dl	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido

dNTPs	Desoxirribonucleótidos
dpi	Días post infección
E	Proteínas de envoltura del BVDV
E2r	E2 recombinante
ecp	Efecto citopático
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Eif	Factor de Iniciación eucariótico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERI	Eritrosedimentación
FAL	Fosfatasa alcalina
Fc	Fracción constante
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fl	Femtolitro
Flt3L	Ligando de tirosina quinasa 3 tipo FMS
GAGs	Glicosaminoglicanos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HCMV	Citomegalovirus humano
hMRC1	Receptor de manosa humana tipo C1
hpi	Horas post infección
Hto	Hematocrito
ICTV	Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus
IFN	Interferones
IL	Interleuquina
IL2R	Receptor de IL-2
IMF	Intensidad de fluorescencia media
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IP	Intraperitoneal
IRES	Sitio Interno de Entrada al Ribosoma
IRF	Factor regulador del IFN
ISG	Genes estimulados por IFN
IV	Intravenosa
IVIT	Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas
Kb	Kilobases
Kg	Kilogramo
l	Litro
LB	<i>Luria Broth</i>
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>
MD	Enfermedad de las mucosas
MDBK	<i>Madin-Darby bovine kidney</i>
MEMD	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
MEMDc	MEMD completo

MEMDi	MEMD incompleto
mg	Miligramo
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
ml	Mililitro
Mo	Monocitos
Mock	Infección simulada
MOI	Multiplicidad de infección
M ϕ	Macrófagos
M ϕ -Mo	M ϕ derivados de Mo
NC	Neutrófilos en cayado
ncp	No citopático
ng	Nanogramo
NK	Asesinas naturales
nm	Nanometros
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NS	No estructural
NSe	Neutrófilos segmentados
ON	Overnight
ORF	Marco de lectura abierto
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramo
PI	Persistentemente infectado
PrCR	Proteína C reactiva
PRO	Proteínas séricas
PRR	Receptores de patrones moleculares
PRRSV	Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino
qPCR	PCR cuantitativa
RdRP	ARN polimerasa viral dependiente de ARN
RDW-C.V.	Amplitud de distribución eritrocitaria
RE	Retículo endoplasmático
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPE	R-ficoeritrina
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPMIc	RPMI completo
RPMIcs/atb	RPMIc sin antibióticos
RPMIi	RPMI incompleto
RSV	Virus Sincitial Respiratorio
RT	Retro-transcripción
SFB	Suero fetal bovino
STAT	Transductor de Señal y Activador de Transcripción
TA	Temperatura ambiente

TAMs	Mφ asociados a tumores
TCID50	Dosis infectivas 50 % en cultivo
TGO	Transaminasa glutámico oxalacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvico
TLR	Receptores tipo toll
TPC	Terneros Privados de Calostro
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades internacionales
UNLP	Universidad Nacional de La Plata
UNSAM	Universidad Nacional de San Martín
UTR	Regiones no traducidas
UV	Ultravioleta
VCM	Volumen corpuscular medio
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VSV	Virus de la Estomatitis Vesicular
WB	<i>Western Blot</i>
XTT	(2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida)
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µmol	Micromol

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Agente etiológico

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) es el agente etiológico causante de la enfermedad infecciosa más extendida en el ganado bovino en todo el mundo¹. Se clasifica en 2 genotipos principales, BVDV 1 y 2 y un tercer tipo denominado BVDV 3 o Hobi like².

El BVDV pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*. La familia *Flaviviridae* contiene especies de importancia médica como el Virus de la Fiebre Amarilla, el Virus del Dengue y el Virus de la Hepatitis C (HCV, del inglés *Hepatitis C Virus*), entre otros³. El género *Pestivirus* está comprendido por cuatro especies, BVDV tipo 1, BVDV tipo 2, Virus de la Enfermedad de la Frontera (BDV, del inglés *Border Disease Virus*) y Virus de la Fiebre Porcina Clásica (CSFV, del inglés *Classic Swine Fever Virus*), los cuales infectan rumiantes domésticos y salvajes, cerdos y jabalíes⁴. Recientemente el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV, del inglés *International Committee on Taxonomy of Viruses*) a través del “*Flaviviridae Study Group*” propuso la inclusión de 7 nuevas especies al género y una reformulación completa de la nomenclatura del grupo. De esta manera todas las especies se nombrarían como *Pestivirus A-K*, de forma independiente a la especie hospedadora, aunque con algunas excepciones para hacerlo más sencillo de recordar. Por ejemplo, *Pestivirus G* es una especie que infecta a jirafas, por su nombre en inglés *Giraffe*. Los BVDV 1 y 2 pasarían a designarse como *Pestivirus A* y *B* respectivamente. El BVDV tipo 3, o Hobi like pasaría a denominarse *Pestivirus H*⁴.

1.2. Morfología viral

1.2.1. Proteínas estructurales y envoltura viral

El BVDV es un virus envuelto, aproximadamente esférico de entre 50 y 60 nm de diámetro. En condiciones de cultivo la mayoría de las partículas tiene 50 nm de diámetro, mientras que alrededor del 2 % mide unos 60 nm. Se ha reportado que el BVDV tiene capacidad de incorporar regiones de ácido ribonucleico (ARN) del huésped en su genoma. Estas partículas de

mayor tamaño podrían contener genomas más grandes, lo que daría cuenta de cierta flexibilidad en el ensamblaje del virión. No obstante no se descarta que se trate de partículas aberrantes. La naturaleza polimórfica de la cápside es compatible con una estructura no icosaédrica, o bien con una estructura icosaédrica con variaciones en el número de triangulación⁵. Posee 4 proteínas estructurales: las glicoproteínas de envoltura (E) E1, E2 y E^{rns} y la proteína de nucleocápside C. La proteína C contiene la secuencia señal para translocación al retículo endoplasmático (RE). Las proteínas E están presentes como complejos unidos por puentes di-sulfuro: el homodímero E^{rns} con actividad ribonucleasa (ARNasa), el heterodímero E1-E2 y el homodímero E2. E1 y E2 poseen dominio transmembrana, pero no se encuentran en la membrana celular, sino en membranas internas. La proteína E^{rns} carece de dominio de anclaje transmembrana por lo que puede ser secretada al medio extracelular. E^{rns} parece participar en la adhesión inicial del virus a la célula huésped y en el virión maduro aparece asociada a E2⁶. Posee actividad ARNasa intrínseca y constituye un mecanismo de evasión del sistema inmunitario del huésped⁷, al degradar el ARN intracelular y extracelular evitando las señales de alarma para la inmunidad innata y previniendo la formación de interferón (IFN). La degradación del ARN viral tiene lugar en el compartimento endosomal, evitando la salida de ARN viral al citosol⁸. El ARN viral, junto con otros grupos de moléculas actúan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen associated molecular patterns*) los cuales son identificados por receptores de la inmunidad innata, desencadenando respuestas proinflamatorias y/o de IFNs.

El heterodímero E1- E2 es necesario para la entrada del virus a la célula⁹. Entre las proteínas estructurales, la proteína C es la proteína más abundante, seguida de E^{rns}, mientras que E1 y E2 muestran una presencia limitada. Sin embargo, en la superficie del virión, E2 es la proteína de superficie más abundante e induce una respuesta inmune neutralizante contra BVDV, seguida por E^{rns}. E2 media el reconocimiento del receptor en la superficie celular y es necesario para la entrada del virus en la célula^{9,10}. En comparación con las células huésped, los lípidos de BVDV contienen más colesterol, esfingomielina y hexosilceramida y menos fosfolípidos de glicerol. Se demostró que el colesterol y la esfingomielina son importantes para la entrada de BVDV⁸.

1.2.2. Genoma viral

El genoma viral está formado por ARN monocatenario (ARNcs) de polaridad positiva de entre 11,3 y 13 Kilobases (Kb) flanqueado en ambos extremos por Regiones no Traducidas (UTR, del inglés *Untranslated Region*). El extremo UTR 5' contiene un Sitio Interno de Entrada al

Ribosoma (IRES, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*) con una extensión de entre 370 y 385 pares de bases (pb). El extremo 3' de entre 185 y 273 pb posee regiones variables y una región terminal altamente conservada importante en la replicación del ARN viral¹¹. El genoma contiene un único Marco de Lectura Abierto (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) y codifica una poliproteína de alrededor de 3900 aminoácidos (aa).

1.2.3. Proteínas no estructurales

El BVDV posee 8 proteínas no estructurales (NS, del inglés *Non Structural*) N^{pro}, p7, NS2-3 (y/o NS2-NS3), NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Durante la traducción de la poliproteína, la primera proteína emergente es N^{pro} con actividad autocatalítica cisteín-proteasa, la cual es catalizada por la triada de residuos Glu22-His49-Cys69. Esta se libera de la poliproteína naciente y ejerce una función temprana de evasión inmunitaria, uniéndose al Factor Regulador de IFN (IRF, del inglés *Interferon Regulatory Factor*) 3 y secuestrándolo para su degradación¹². IRF3 es un regulador central de la transcripción de IFN e iniciador de apoptosis¹³. La delección de N^{pro} no tiene efecto en la replicación viral o la virulencia, sin embargo, la expresión de N^{pro} por sí sola en células de línea ha demostrado inhibir la apoptosis y la producción de IFN¹⁴. N^{pro} interactúa con alrededor de 55 proteínas formando parte de la maquinaria de transcripción.

Aguas abajo en la poliproteína, siguen las proteínas estructurales con señales blanco para péptido-petidasa y peptidasas celulares. Hacia 3' el pequeño polipéptido p7 también es clivado por peptidasas celulares. p7 es mayormente hidrofóbico con pequeños dominios hidrofílicos típicos de las vioporinas. La evidencia apunta a que forma un pentámero y participa en la fusión de membranas para la liberación del virión¹⁵. El clivaje de p7 no es del todo eficiente, porque se observan péptidos E2-p7, y péptidos E2 y p7 por separado. Se desconoce la función del heterodímero E2-p7 porque no es necesario para la producción de virus infectivos, mientras que si se suprime E2 o p7, no se produce progenie viral¹⁶. Aguas abajo la proteína NS2-3 es una proteasa con actividad autocatalítica que libera a NS2 y NS3, mientras que NS3 es una serín proteasa que libera el resto de las proteínas virales de la poliproteína, utilizando a NS4A como cofactor. NS3 además es una ARN helicasa/Nucleósido trifosfatasa que participa en la replicación del ARN viral. NS3 se produce en grandes cantidades en cepas citopáticas (cp) mientras que en cepas no citopáticas (ncp) su producción se limita a las primeras 8 horas de infección. La función de NS4B no es del todo conocida aunque si se introducen sustituciones en el residuo 15 de su secuencia se producen cambios en la

citopatogenicidad viral¹⁷. Además NS4B probablemente forme parte del complejo de replicación asociado a membranas¹⁸.

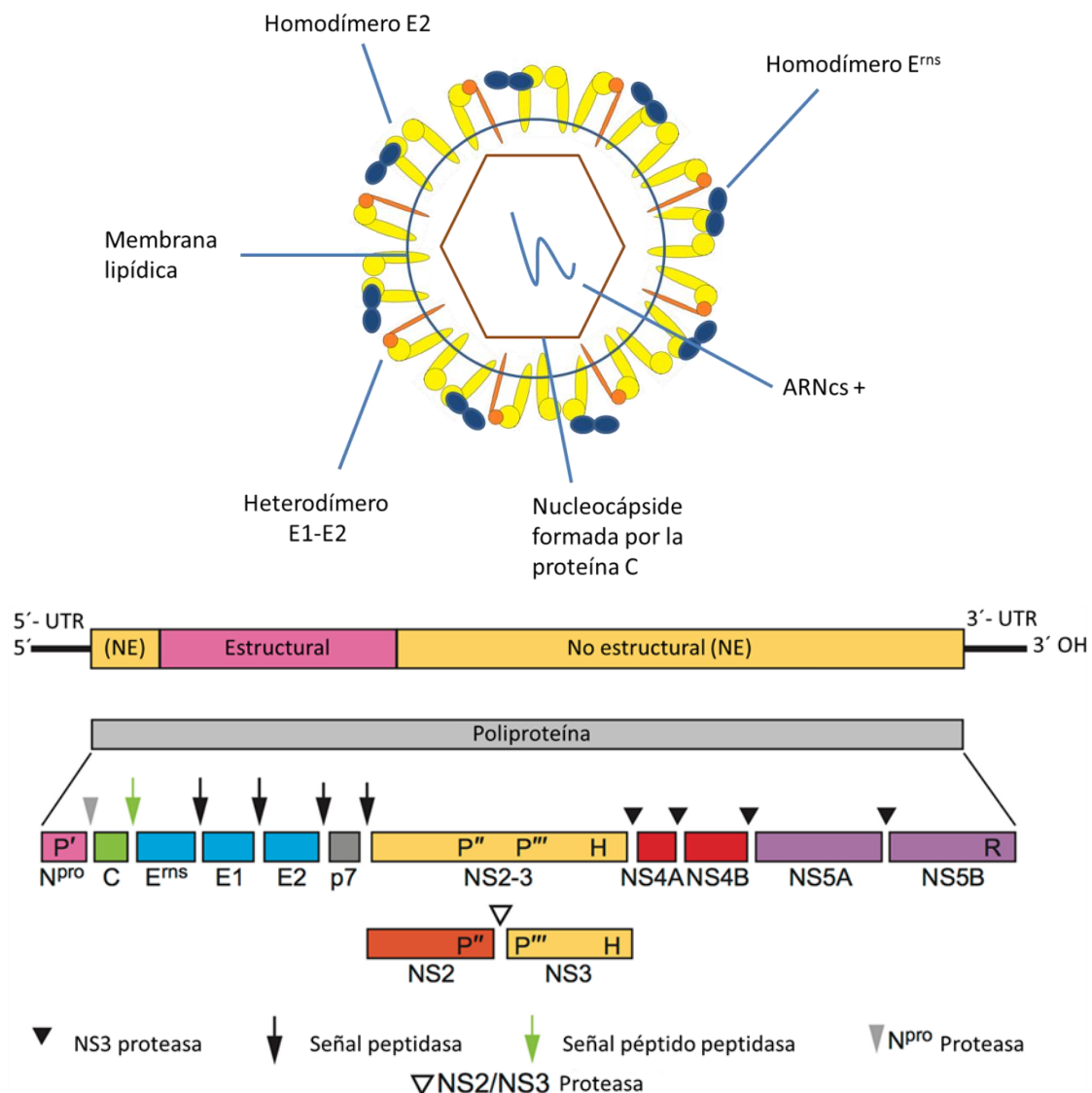


Figura 1. Representación gráfica del virión maduro de BVDV (arriba) y del genoma y el polipéptido traducido (abajo). Arriba. El virión está formado por las proteínas estructurales de la cápside C y de la envoltura E1, E2 y E^{ms}. E^{ms} carece de dominio transmembrana y aparece como un homodímero probablemente asociado a la proteína E2. E2 aparece como un homodímero y E1-E2 forman un heterodímero necesario para la entrada e infectividad del BVDV a la célula. E1 y E2 poseen dominio transmembrana. La membrana del virión rodea a la cápside formada por repeticiones de la proteína C. Dentro de la cápside se encuentra el ARNcs positivo. Abajo. Organización genómica de Pestivirus (fuera de escala) y procesamiento de la poliproteína. El ARN viral está flanqueado por regiones 5' y 3' UTR. Las proteínas no estructurales se indican como (NS). Los símbolos P', P'', P''', H y R indican la localización de la proteasa N^{pro}, NS2 proteasa, NS3 proteasa, NS3 ARN helicasa y la NS5B RdRP respectivamente. Los pasos proteolíticos y de proteasas involucrados en la generación de proteínas individuales están indicados. En cepas ncp el clivaje NS2-3 se detecta en la infección temprana, mientras que en las cepas cp la NS2-3 y la NS3 se producen continuamente. *Adaptado del 10º reporte en línea del ICTV.*

Por último, NS5A es cofactor de NS5B la cual tiene actividad ARN polimerasa viral dependiente

de ARN (RdRP). En la **Figura 1** se representa esquemáticamente el virión maduro del BVDV, el genoma viral y el polipéptido traducido.

1.3. Genotipos y biotipos virales

El BVDV se clasifica en 2 genotipos principales, denominados BVDV 1 y BVDV 2. Recientemente se ha adicionado un tercer miembro denominado “HoBi-like” o “Pestivirus atípico” identificado como BVDV 3^{2,4,19}. Dentro del genotipo 1 se han descrito 21 subgenotipos diferentes (1a hasta 1u)^{19,20} y dentro del BVDV 2 se han descrito 4 subgenotipos distintos (2a hasta 2d)²¹.

La clasificación genotípica del BVDV y otros *Pestivirus* se realizó utilizando distintas regiones del genoma viral, como las regiones 5'UTR, N^{pro}, E2, NS2-3 y NS5B-3'UTR, siendo la región 5'UTR seguido por regiones codificantes de N^{pro} y E2 las más utilizadas para la clasificación de la mayoría de los subgenotipos. La región 5'UTR permite usualmente la distinción dentro de especies de *Pestivirus*, por ejemplo BVDV 1, mientras que las regiones codificantes E2 y N^{pro} permiten la clasificación dentro de subgenotipos con altos niveles de confianza^{20,22}.

Los cambios genómicos en los *Pestivirus* resultan de 3 procesos principales, i) acumulación de mutaciones puntuales, propias de los errores introducidos por la RdRP, ii) recombinación no homóloga de ARN y iii) recombinación homóloga de ARN.

Asumiendo que la tasa de mutación del BVDV es similar a la de otros *Pestivirus*, se estima que se introduce aproximadamente una mutación puntual en el genoma del BVDV por ciclo de replicación²⁰.

Las recombinaciones no homólogas pueden dar lugar a la generación de cepas de biotipo cp, que pueden incluir una gran variedad de arreglos genómicos. Algunas cepas cp pueden integrar un segmento pequeño y variable de ARN de la célula huésped (dentro de NS2 o aguas arriba de NS3) a menudo acompañado de duplicaciones o deleciones de genoma viral^{23,24}. Estas alteraciones suelen ir acompañadas de clivaje de la proteína viral NS2-3 en NS2 y NS3, produciéndose esta última durante todo el ciclo de replicación viral e induciendo apoptosis²⁵. Las cepas cp manifiestan su efecto en cultivos celulares epiteliales y se originan a partir de mutaciones en cepas de BVDV ncp independientemente de su genotipo, únicamente en el contexto de la llamada enfermedad de las mucosas (MD, del inglés *mucosal disease*)²⁶. La gran mayoría de las cepas circulantes en el campo son ncp. Las cepas cp portan mutaciones únicas de cada cepa particular y no son capaces de establecer cadenas de infección. Además su

aparición conlleva la muerte del animal, por lo que no son relevantes en la evolución del BVDV²⁶. Las cepas ncp tienen tropismo por leucocitos, órganos linfoides y el tracto respiratorio, mientras que las cepas cp se encuentran restringidas al tracto digestivo²⁷.

Las recombinaciones homólogas se han descrito para BVDV dentro del mismo subgenotipo, entre especies de distintos subgenotipos e incluso entre BVDV de tipo 1 y 2 y junto con la acumulación de mutaciones puntuales son importantes en la generación de nuevas variantes²⁰. En este contexto se ha concluido que la genotipificación del BVDV no debe hacerse en base a una región única y restringida del genoma. La emergencia de nuevas variantes, puede obstaculizar el diagnóstico y la efectividad de las vacunas para BVDV existentes.

Estudios epidemiológicos han mostrado distintos predominios de subgenotipos de BVDV en diferentes países y no solamente en ganado bovino, también en cerdos y en una amplia gama de huéspedes rumiantes, como ovejas, cabras, búfalos, llamas y camellos. El BVDV de tipo 1, es el de mayor predominio a nivel mundial constituyendo el 88,2 % de los reportes hasta 2017. El genotipo con más reportes a nivel mundial es el 1b, seguido de 1a y 1c. Considerando continentes individuales, el genotipo 1b es el predominante en América, Asia y Europa, mientras que más del 90 % de los aislamientos de Australia pertenecen al genotipo 1c. En África el número de reportes es mucho menor, y está lejos de ser representativo. No obstante, al menos en Sudáfrica el genotipo 1a predomina sobre los demás. El BVDV de tipo 2 se identificó primeramente en Canadá y Estados Unidos y se ha reportado en varios países de Europa. Dentro de este genotipo el subgenotipo 2a es el de mayor prevalencia en el mundo. La variante 3 o HoBi-like ha sido aislada en Brasil, Italia, India y Tailandia entre otros²⁰. En el Noreste Argentino se han hallado evidencias serológicas de circulación de HoBi like en muestras bubalinas²⁸. Los genotipos predominantes en nuestro país son 1a y 1b, con el 85 % de los aislamientos²⁹.

1.4. Ciclo viral

1.4.1. Adsorción e internalización

Como se ha señalado, la envoltura del BVDV contiene las glicoproteínas E^{rns}, E1 y E2. Estas proteínas E están presentes en el virión como dímeros unidos por puentes di-sulfuro: el homodímero E^{rns}, el heterodímero E1-E2 y el homodímero E2.

La proteína E^{rns} tiene la capacidad de unirse a glicosaminoglicanos (GAGs) de superficie por lo que podría participar en procesos de unión iniciales del virus a la superficie celular. E^{rns} no se

une a líneas celulares que carecen de GAGs, o heparán sulfato. También se une a heparina inmovilizada en agarosa. Además, la heparina, fucoidán y dermatán sulfato inhiben la unión de E^{rns} a las células donde E^{rns} queda naturalmente adsorbida en superficie. No son capaces de inhibir esta unión, el sulfato de dextrano, sulfato de queratán, condroitín sulfato y mananos por lo que probablemente no participen en la unión³⁰. E^{rns} carece de secuencia transmembrana y es secretada por células infectadas con el BVDV, manteniendo actividad ARNasa dentro y fuera de la célula, como un mecanismo de evasión, posiblemente orientado a eliminar ácidos nucleicos que podrían actuar como PAMPs.

Se ha identificado a CD46 como un receptor de BVDV que interactúa con la proteína viral E2^{31,32}. CD46 es una proteína reguladora del complemento. Posee cuatro estructuras modulares repetidas, denominadas módulos de proteína de control de complemento (CPP, del inglés *Single Complement Control Protein modules*) en su dominio extracelular. La unión a los factores del complemento C3b y C4b ocurren en los CPP2, CPP3 y CPP4. Se atribuyó a CPP1 la capacidad de unión e infección del BVDV. Dentro de CPP1 una región con 2 péptidos de hoja beta antiparalela fueron identificados como cruciales para unirse al BVDV³¹. La expresión de CD46 en células de cerdo, aumenta 100 veces la susceptibilidad al BVDV. Se ha reportado la presencia de CD46 soluble en plasma bovino con capacidad de neutralización del virus³³. No obstante, la expresión de CD46 en células humanas o murinas no susceptibles al BVDV, no las hace susceptibles a la infección, aunque estas células soporten la replicación del ARN viral³⁴. Por otro lado, CD46 se encuentra excluido de la vesícula endosomal³². Estos hallazgos sugieren la existencia de uno o más correceptores para el BVDV.

El receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL, del inglés *Low Density Lipoprotein*) ha sido sugerido como candidato, puesto que ha sido identificado como receptor en otros Flavivirus, además del BVDV. Agnello y col³⁵ señalan que la línea celular "CRIB" (del inglés *Cells Resistant to Infection with BVDV*) que es capaz de soportar la replicación de ARN viral, pero que no puede ser infectada por el BVDV, no expresa el receptor de LDL. Por otro lado, Krey y col³⁴ señalan que la línea celular CRIB sí expresa el receptor para LDL y lo hace de manera constitutiva. No obstante, cuando utilizaron 2 anticuerpos anti-LDL estos no fueron capaces de bloquear la entrada del virus, por lo que este punto respecto a LDL permanece controversial.

Con el fin de dilucidar cuál/es de los dímeros de proteínas E del virión están involucrados en la entrada del BVDV a la células susceptibles, Ronecker y col.⁹ produjeron virus pseudotipados, complementando el BVDV y el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV, del inglés *Vesicular Stomatitis Virus*) con distintas combinaciones de las proteínas de E del BVDV en la superficie del virus. Los autores llegaron a la conclusión de que el heterodímero E1-E2 es necesario para el ingreso del virus a la célula, mientras que E^{rns} es dispensable. Además comprobaron que los

virus que expresaban cualquiera de las combinaciones del heterodímero con proteína/s quimérica/s con ectodominio del BVDV y dominio transmembrana del VSV no eran infectivos, sugiriendo que toda la integridad del heterodímero E1-E2 es necesaria para la infección. Ensayos de mutagénesis dirigida sobre residuos cargados transmembrana de E1 (lisina y arginina) y de E2 (lisina), mostraron que estos aa son cruciales para la formación del heterodímero⁹. Los homodímeros E2 parecen cumplir, junto con E^{tns}, funciones de adhesión a la célula huésped. No se han encontrado en su secuencia, motivos con funciones fusogénicas de membrana⁸.

La interacción del heterodímero E1-E2 probablemente con CD46 y su correceptor/es desencadena la endocitosis mediada por clatrina^{36,37}. Luego la acidificación del endosoma provoca la fusión de membranas, aunque el mecanismo no es del todo conocido. Las ATPasas vacuolares acidifican el lumen del endosoma a medida que la endocitosis tiene lugar, descendiendo a un pH de 5,6 en un endosoma tardío. Este pH ácido no es suficiente para provocar que el virus adsorbido en la membrana endosomal fusione su membrana “desde afuera”. Esta observación es compatible con la considerable resistencia a inactivación por pH ácido que presentan los *Pestivirus*. La desestabilización del virión debe estar acompañada por ruptura de los abundantes puentes disulfuro presentes entre los dímeros de las proteínas E en la membrana del virión, pero este mecanismo no es conocido³⁶. Omari y col. sugieren que la proteína E1 formando parte del heterodímero junto con E2, sería responsable de la fusión de membranas. Concretamente gracias a una región hidrofóbica presente entre los residuos 57 a 85 que actuaría como región fusogénica³⁸. Una vez fusionadas las membranas la nucleocápside se libera al citosol. El mecanismo de desnudamiento y liberación del ARN en el citosol no está descrito para BVDV. En el Dengue, un representante de la familia *Flaviviridae*, la liberación del ARN de la nucleocápside requiere un paso de ubiquitinación sin actividad degradativa del proteosoma³⁹. Se representa esquemáticamente la internalización del BVDV y la liberación del ARN viral en la **Figura 2**.

1.4.2. Replicación y liberación

El genoma viral es una molécula de ARNcs positivo que ya puede actuar como ARN mensajero (ARNm) con un único ORF. En su extremo 5´ posee una estructura IRES que es reconocida por la subunidad 40S y el Factor de iniciación eucariótico (eIF, del inglés *Eukaryotic initiation factor*) 3 que dirige la traducción independiente de la caperuza. La traducción no requiere los factores de iniciación eIF4B y eIF4F. La replicación y la traducción ocurren asociadas a las

membranas del RE. Se sintetiza una poliproteína que es escindida y procesada co- y post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales, liberando las proteínas virales N^{pro} , C, E^{ms} , E1, E2, p7, NS2-NS3 (o NS2 y NS3), NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B (**Figura 1**). Como se mencionó antes, N^{pro} se autocliva mientras se traduce el polipéptido, liberándose del péptido emergente y ejerciendo funciones de inmunoevasión¹³. Una secuencia señal en el extremo carboxiterminal de C, dirige a la proteína creciente hacia la membrana del RE. Señales para peptidasas liberan a la proteína C al lumen del RE. Esta es altamente básica y forma la cápside conteniendo una cadena de genoma viral⁴⁰. Todas las proteínas E son producidas a partir del péptido precursor Erns/E1E2, el cual atraviesa un clivaje de dos pasos que produce las proteínas libres E^{ms} , E1, y E2⁸. Ni E^{ms} , ni E2 se encuentran en la membrana plasmática de células infectadas, pero sí se encuentran asociadas a membranas intracelulares⁴¹.

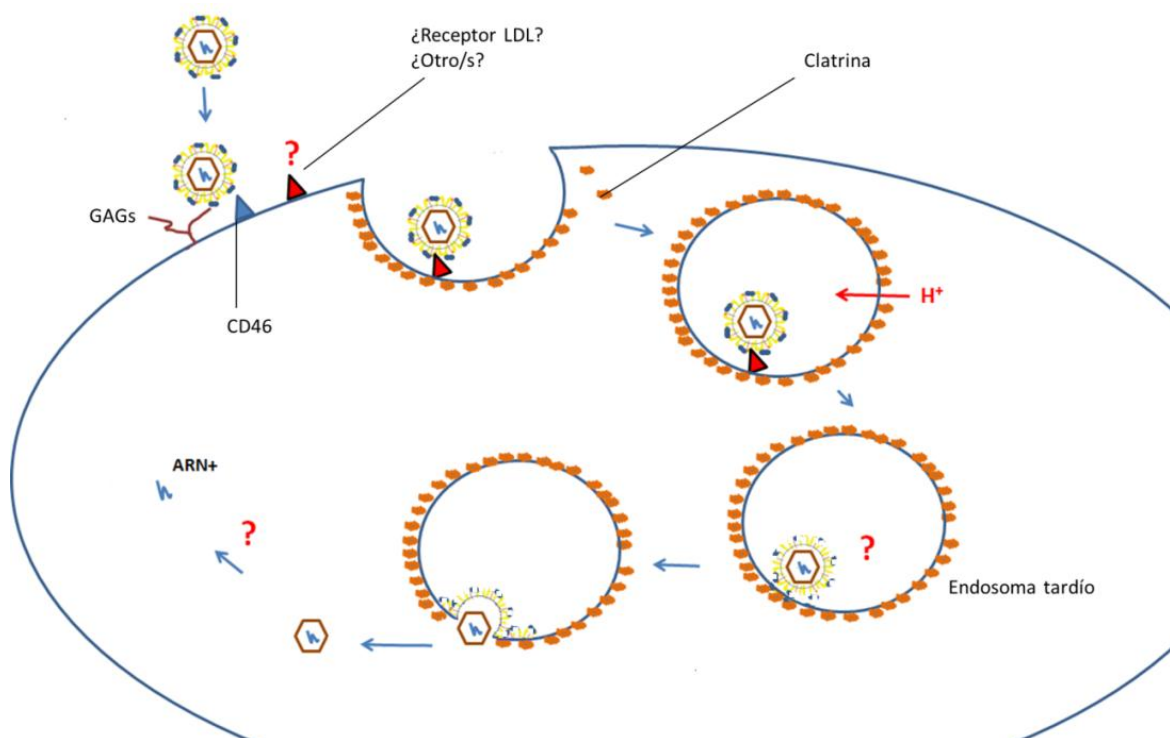


Figura 2. Representación de la entrada del BVDV en la célula. El virus puede quedar inicialmente adsorbido por la interacción de la proteína E^{ms} con GAGs. Luego hay una interacción del heterodímero E1-E2 con el CPP1 de CD46 y probablemente otro/s receptor/es, entre los cuales podría estar el receptor de LDL. La adsorción del virus desencadena la formación del endosoma recubierto con clatrina. CD46 no es internalizado en el endosoma, por lo que es probable que el virus ingrese con otro/s receptor/es. La acidificación del endosoma tardío no es suficiente para provocar la fusión de membrana y asiste un mecanismo desconocido probablemente relacionado con la ruptura de puentes disulfuro en las glicoproteínas de envoltura. La fusión de membranas puede ocurrir a través de E1. La nucleocápside se libera al citoplasma y el desnudamiento del virus ocurre por un proceso desconocido, liberando el ARNcs +.

La replicación de BVDV ncp se encuentra regulada por el mecanismo de clivado de NS2-3, el cual es catalizado por la proteasa NS2, que requiere de cofactor celular limitante, DNAJC14. Como se señaló anteriormente, la liberación de NS3 es esencial para el complejo de replicación viral. La Actividad RdRP es llevada adelante por NS5B con su co-factor NS5A. NS4B probablemente también forme parte del complejo. Se sintetizan cadenas de ARN negativas a partir de la ARN positiva. Estas cadenas sirven de molde para la síntesis de nuevas cadenas de ARN positivas que constituyen los nuevos genomas virales⁸.

A través de mecanismos no del todo conocidos, la cápside se envuelve con membranas derivadas del RE, repletas de las glicoproteínas E. Las partículas son entonces transportadas desde el lumen del RE por la vía secretoria atraviesan el aparato de Golgi y son liberados por exocitosis hacia el medio extracelular⁴⁰.

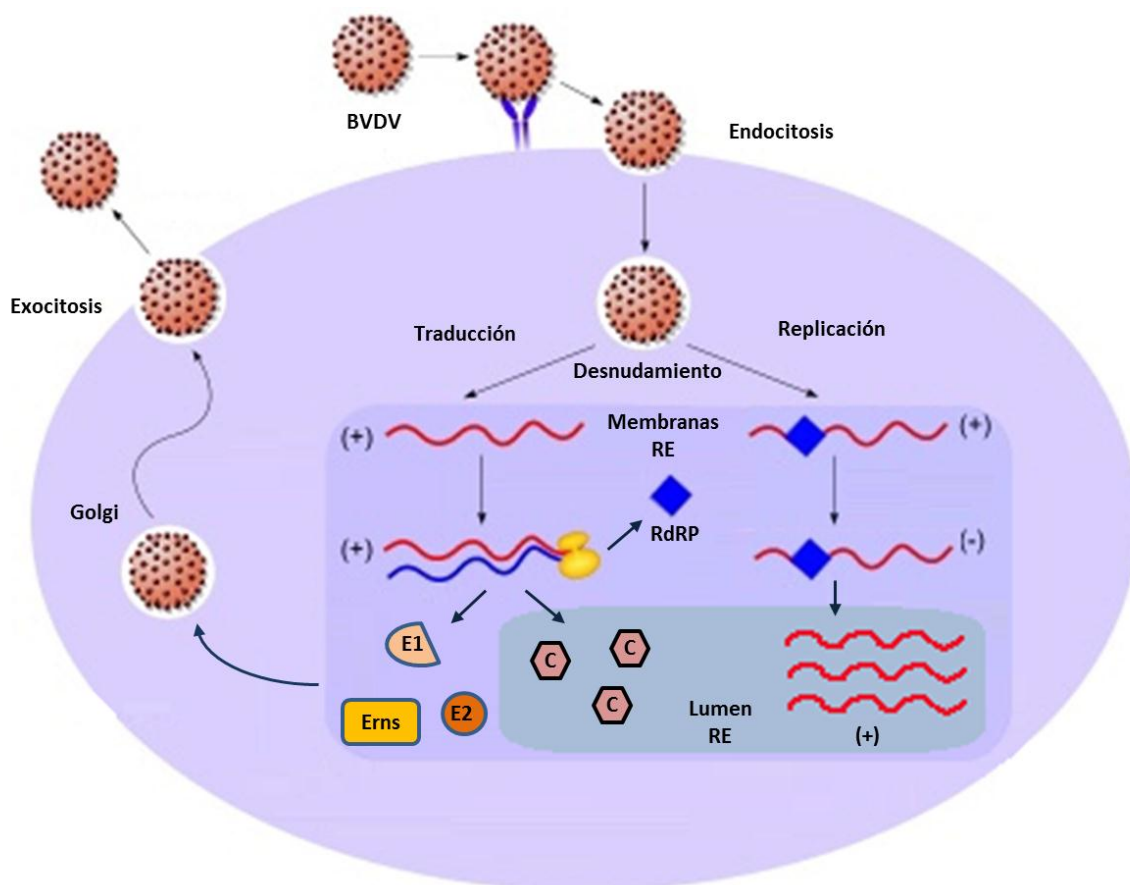


Figura 3. Representación gráfica de la replicación y liberación del BVDV. La replicación y la traducción ocurren asociadas a membranas del RE. El ARN+ es replicado a un ARN-, el cual, a su vez, sirve de molde para replicar las cadenas de ARN+. Las proteínas de E quedan asociadas a membranas del RE, mientras que la proteína C se transloca al lumen donde forma la cápside conteniendo al genoma viral (ARN+). El virión brota por la vía secretora a través del aparato de Golgi, abandonando la célula por exocitosis.

Tras la entrada del BVDV ncp en células ovinas, se ha reportado una fase eclipse que lleva entre 8 y 9 horas. Las cadenas positivas y negativas aparecen a las 4 horas post infección (hpi). Las proteínas E2 y NS3 aparecen a las 6 y 7 horas respectivamente, mientras que NS2-3 se va acumulando. El BVDV aparece intracelularmente a las 8 hpi, mientras que a las 10-12 hpi se liberan viriones maduros infectivos⁸. El esquema de replicación y liberación se resume en la **Figura 3**.

1.5. Epidemiología del BVDV

1.5.1. Transmisión horizontal y vertical

La transmisión horizontal de la enfermedad se produce principalmente por contacto directo de un animal susceptible con un animal infectado que se encuentra excretando virus, principalmente animales persistentemente infectados (PI) presentes en el rodeo. En menor grado, fómites, moscas y equipamiento veterinario contaminado también están implicado en la diseminación viral⁴². El virus es excretado por secreciones oro-nasales y existe evidencia que indica que también puede transmitirse por aerosoles⁴³. Una vez que el virus accede a la mucosa orofaríngea se produce una replicación inicial en células epiteliales, con alta producción viral en las amígdalas palatinas. El virus pasa a diseminarse sistémicamente a través del torrente sanguíneo donde está presente en forma libre e intracelularmente infectando leucocitos. En los toros el virus coloniza las vesículas seminales y la glándula prostática⁴⁴.

La transmisión vertical puede producirse por vacas preñadas que contraen la enfermedad en un período comprendido entre los 30 y 120 días de gestación (comúnmente denominado “período ventana”) ya que el virus es capaz de traspasar la barrera placentaria provocando infección del feto. En el caso de que la gestación llegue a término, el ternero naciente será invariablemente un animal PI que excretará una carga viral muy alta. Otra fuente de animales PI es la utilización de semen contaminado proveniente de toros PI, o bien de semen de animales que transitaban una infección aguda al momento de ser colectado⁴⁵ e incluso de semen proveniente de animales seropositivos no virémicos⁴⁶. El semen contaminado es potencialmente una fuente importante de animales PI, dado que el virus perdura por tiempo prolongado en los testículos^{44,47}.

La infección del feto en un período posterior a los 120 días puede ocasionar malformaciones o abortos y también el nacimiento de un ternero inmunocompetente con una infección transitoria que será superada⁴⁸.

El BVDV combina dos estrategias que lo hacen exitoso y difícil de erradicar de los rodeos en todo el mundo: la estrategia “golpea y corre” caracterizada por infecciones agudas y auto limitadas y las infecciones persistentes con alta excreción viral⁴⁹. No debe subestimarse la importancia de la infección aguda en la transmisión y el mantenimiento del BVDV dentro de una población de animales (domésticos y salvajes). Un reporte hecho en Estados Unidos indica que los animales con infección aguda son responsables de hasta el 93 % de todas las infecciones intrauterinas que resultan en el nacimiento de terneros PI⁵⁰. Por lo tanto, la mayoría de los animales PI provienen de madres que transitaron una infección aguda durante un periodo determinado de la preñez, pero la fuente del virus para la infección aguda es un animal PI⁴². La epidemiología compleja del BVDV se esquematiza en la **Figura 4**.

1.5.2. Infección aguda

La infección de animales con el BVDV induce una amplia variedad de manifestaciones clínicas, desde cuadros subclínicos, a clínicos leves y severos, pudiendo incluso ser mortales. El tipo de enfermedad desarrollado y la sintomatología dependerán en gran medida de la virulencia de la cepa infectante, de la edad, del status fisiológico y sanitario del animal, de factores estresantes, nutricionales, etc. La replicación viral ocurre en una gran variedad de tipos celulares como células epiteliales, tracto digestivo, sistema nervioso, tracto respiratorio y sistema inmune. La viremia puede detectarse a partir de los 3 días post infección (dpi) y se extiende por 2 días hasta unas 2 semanas según la virulencia de la cepa infectante. La infección suele ir acompañada de linfopenia, leucopenia y/o trombocitopenia. La inmunosupresión resultante predispone al animal a padecer infecciones secundarias a menudo más severas. La enfermedad clínica cursa con pirexia, diarrea y sintomatología respiratoria. Existen cepas de genotipo 2 de alta virulencia que pueden provocar enfermedad aguda grave con hipertermia elevada, diarrea profusa, alta incidencia de abortos, reducciones significativas en la producción de leche y cuadros de muerte súbita. La Infección nasal experimental en terneros sanos con BVDV ncp resultó en la localización del virus en enterocitos, placas de Peyer, timo, ganglios linfáticos del bazo, amígdalas e hígado en orden decreciente de concentración¹. El complejo respiratorio bovino es una enfermedad multifactorial con distintos agentes etiológicos virales

como Herpesvirus Bovino 1, Parainfluenza Bovina 3, Virus Sincitial Respiratorio (RSV, del inglés *Respiratory Syncytial Virus*) Bovino o BVDV que actúan como agentes infecciosos primarios, provocando lesiones en la mucosa respiratoria que comprometen la integridad del tracto, permitiendo la colonización por bacterias que provocan infecciones secundarias que agravan el cuadro clínico. La inmunidad se desarrolla entre los 18 y 21 días. Una vez resuelta la enfermedad aguda, puede haber circulación viral en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por hasta 98 días, aunque es improbable que provoquen contagios en esta instancia¹. Las infecciones agudas producen efectos en la fertilidad como la reducción en el éxito de la preñez, reabsorción embrionaria, muerte, abortos y defectos congénitos. En los toros, se observa reducción de la densidad y motilidad espermática. Esta reportado que el BVDV puede persistir en semen durante 2,75 años luego de una infección aguda⁴⁷.

1.5.3. Infección persistente

Como se ha mencionado, la infección persistente se produce cuando una hembra preñada contrae la enfermedad en el periodo ventana de gestación, o bien, a partir de una gestación inducida con semen contaminado con el BVDV (**Figura 4**). Cuando el feto se infecta dentro de dicho período ventana, no presenta un sistema inmunitario desarrollado. En este caso puede producirse aborto, momificación fetal y formación de varios tipos diferentes de anomalías congénitas como hipoplasia cerebelosa, malformaciones esqueléticas y retraso general del crecimiento. Si la gestación llega a término el ternero no presentará signología clínica y será inmunotolerante a la cepa infectante. Es decir que no presentará anticuerpos frente al BVDV pero mantendrá la excreción viral durante toda su vida. Los animales PI constituyen el principal reservorio viral en los rodeos. La prevalencia de animales PI oscila entre 0,5 y 2 % y cualquier estrategia que abogue por erradicar al BVDV debe poder identificar y eliminar a los animales PI. Otro punto importante en la epidemiología de la enfermedad es el contacto con otras especies susceptibles, de producción o silvestres. La transmisión inter-específica es un fenómeno frecuente que establece nuevos reservorios virales. Se ha reportado la transmisión de animales PI hacia cabras que a su vez ha perdurado por dos generaciones de cabras⁸. Si bien los animales PI son normales en apariencia, pueden ser más susceptibles a otras enfermedades comunes como neumonía. La mayoría de los animales PI acabará desarrollando la MD entre los 6 meses y 2 años de edad⁴².

1.5.4. Enfermedad de las mucosas

La MD se desarrolla cuando el BVDV ncp presente en un animal PI sufre una mutación que provoca la aparición de una cepa cp con liberación de NS3 durante todo el ciclo de replicación viral (**Figura 4**). Los signos clínicos característicos de la MD incluyen anorexia, fiebre, diarrea, deshidratación, presencia de lesiones en la mucosa del tubo digestivo, necrosis del tejido linfoide, inflamación de las pezuñas y muerte. La dermatitis es un signo frecuentemente presente en MD y es el hallazgo común de BVDV en muestras de biopsia de piel en ganado PI, lo que confirma el tropismo del virus por la célula epitelial⁴². Otros hallazgos son la presencia de neutropenia y trombocitopenia. Las infecciones bacterianas como neumonía, mastitis y metritis secundarias pueden manifestarse. Una pequeña proporción de animales con MD sobrevive a la enfermedad y desarrolla una forma crónica de la enfermedad, caracterizada por diarrea intermitente, debilidad muscular, anorexia, lesiones en la piel y descarga nasal y ocular⁵¹.

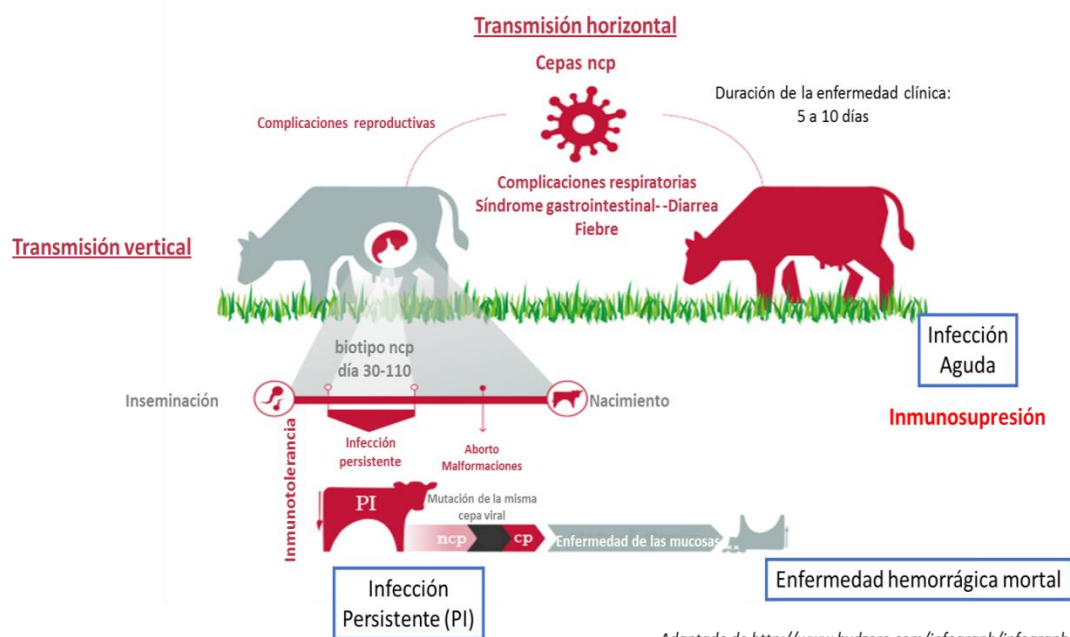


Figura 4. Representación esquemática de la compleja epidemiología del BVDV. Las infecciones agudas son causadas por cepas ncp, causando una enfermedad clínica de hasta 10-14 días que causa inmunosupresión. Si la infección se produce en un periodo ventana de la gestación, puede causar abortos, malformaciones, o el nacimiento de un ternero PI. Estos serán inmunotolerantes a la cepa infectante y excretará gran cantidad de virus. Eventualmente en un animal PI puede surgir una cepa cp a partir de la cepa infectante, causando la MD.

1.6. Proteínas antigénicas del BVDV

El BVDV tiene 4 polipéptidos antigénicos principales: NS2-3, y las proteínas de E^{rns}, E1 y E2. La proteína NS2-3 es muy inmunogénica, provoca una fuerte respuesta en vacunas de virus atenuados y una respuesta débil en vacunas de virus inactivados. Los anticuerpos frente a NS2-3 cruzan con los de otros *Pestivirus* como el CSFV y el BDV. La proteína NS3, inducida típicamente por infecciones con cepas cp, es altamente estable en células infectadas, es muy inmunogénica y son las más conservadas dentro del género. La proteína E^{rns}, se encuentra altamente glicosilada y provoca una respuesta potente de anticuerpos, pero su actividad neutralizante es limitada. La proteína E1 desencadena una respuesta pobre de anticuerpos. E2 en cambio, es muy antigénica; en el BVDV tipo 1 presenta un epítipo, mientras que en el BVDV tipo 2, tiene 3 epítipos. Si bien existe reacción cruzada, se ha identificado un anticuerpo monoclonal que solo reconoce la E2 de BVDV de tipo 1⁵². En un trabajo publicado en 2014, Asfor y col.⁵³ produjeron distintas glicoproteínas recombinantes E2 pertenecientes a BVDV tipo 1, tipo 2 y a CSFV, e infectaron con los mismos virus homólogos. Encontraron que la inhibición causada por E2 correlacionaba con la homología de la E2 presente en el virus utilizado en la infección, indicando que E2 otorgaría especificidad en la infección entre los *Pestivirus*.

1.7. Diagnóstico

El diagnóstico del BVDV se basa en dos pruebas típicas: la detección de anticuerpos específicos o la detección de antígenos virales. Para los programas de control de BVDV, se pueden definir dos niveles de diagnóstico principales; uno de ellos de vigilancia a nivel poblacional o del rebaño y otro de nivel individual. Se testea la presencia de anticuerpos con el objetivo de evaluar seroprevalencia y estudiar el impacto de las medidas de control y erradicación. A nivel individual, los esfuerzos se centran en la identificación y remoción de animales PI, certificación del status sanitario de animales con fines comerciales, por ejemplo, contaminación del semen^{45,47,54,55}.

La presencia de anticuerpos frente al BVDV en suero implica que el animal estuvo en algún momento de su vida en contacto con el virus, o bien que fue vacunado contra el BVDV, o que presenta anticuerpos calostrales. Los anticuerpos proporcionados por una infección natural o por vacunación pueden durar toda la vida del animal^{56,57}. Para medir anticuerpos se recomienda utilizar un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) que contienen antígenos virales conservados, como ser

NS3 (P80) para poder identificar cualquier variante del virus. La seroneutralización o los ELISA basados en la glicoproteína E2 son menos sensibles para detectar diferentes variantes del virus.

Como se mencionó antes, los animales PI excretan grandes cantidades de virus y mantienen la circulación viral en los rodeos, no presentando anticuerpos frente a la cepa infectante. Los animales que transitan una infección aguda, no son muy importantes desde el punto de vista de la transmisión de la enfermedad, suelen tener síntomas leves y excretan virus por un periodo limitado de tiempo. La epidemiología compleja del BVDV conlleva a que el diagnóstico por detección de antígenos deba realizarse dos veces, con un intervalo mínimo de 3 semanas, para diferenciar animales PI de animales que sufrieron una infección aguda⁵⁸. La detección de antígeno viral se puede realizar por ELISA, detectándose generalmente NS3; o bien mediante técnicas moleculares que implican un ensayo de retro-transcripción (RT) seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Suelen utilizarse técnicas clásicas para aumentar la sensibilidad (RT-PCR anidada) o bien RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) que además permite cuantificar número de copias de genoma viral. Se utilizan muestras de tejido epitelial auricular, sangre entera o suero. En el caso de los terneros, el diagnóstico de antígenos por ELISA en muestras de sangre o suero debería realizarse después de las 5 semanas para evitar la interferencia de anticuerpos maternos en la detección del virus en animales PI⁵⁹.

1.8. Situación global del BVDV

Varios factores influyen en las prevalencias informadas de BVDV, como el período de muestreo, el tipo de producción, la edad de los animales muestreados, el uso de vacunas anti-BVDV, las pruebas de animales con o sin signos clínicos, la implementación de programas de control y/o erradicación y diferentes métodos de diagnóstico aplicados⁵⁸.

Un estudio de países europeos entre 1974 y 1995 realizado Houe⁶⁰ determinó que la prevalencia de animales PI osciló entre 0,5 y 2 % y que la prevalencia de anticuerpos frente al virus varió entre 60 y 85 %. En un meta análisis publicado en 2018 que cubrió 325 estudios en 73 países, Scharnböck y col⁵⁸ reportaron una caída en el porcentaje de animales PI entre 1980 y 2016 a nivel global de 1,85 % hasta 0,36 %. Considerando la presencia de animales PI a nivel de rodeos, esta declinó desde 42,36 % hasta 18,88 % también a nivel global. La seroprevalencia global se mantuvo casi constante en el período de estudio, oscilando desde 48,73 a 46,23 % a

nivel de animal individual y de 67,01 % a 66,08 % a nivel de rodeos. Los resultados de este estudio se muestran en la **Figura 5**.

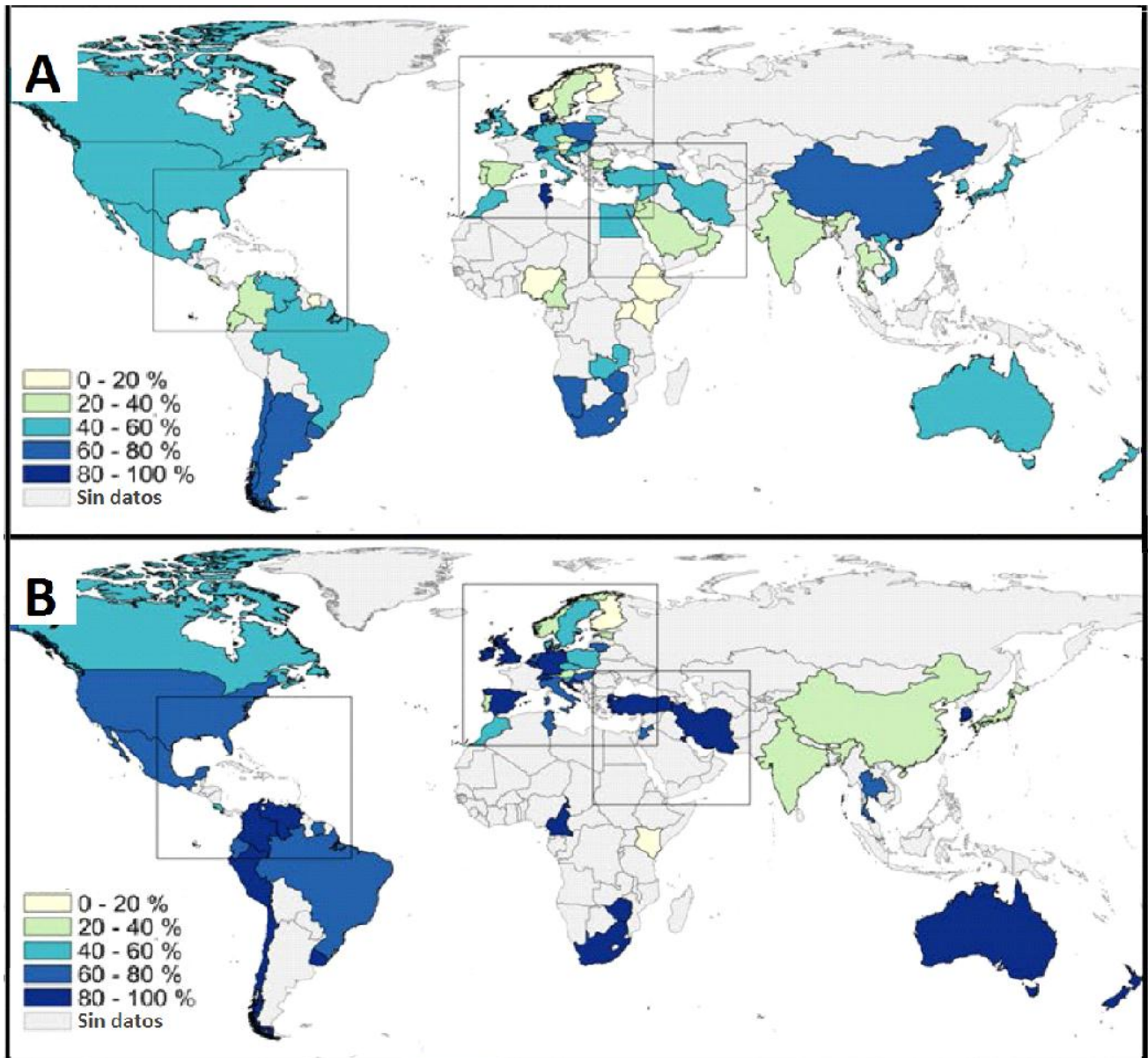


Figura 5. Prevalencia de anticuerpos promedio por país a nivel global en el periodo 1961 – 2016. Se muestran prevalencias a nivel de animal individual (A), y a nivel de rodeos (B). Adaptado de Scharnböck y col.⁵⁸.

El éxito en la remoción de animales PI, y el consiguiente control de la enfermedad en algunos países de Europa es notable. Por ejemplo, Suiza experimentó una caída desde 1,4 a 0,02 % de animales PI entre 2008 a 2012, Alemania de 0,48 % en 2011 a 0,01 % en 2017, Austria bajó desde 0,13 % en 2006 a 0,00 % en 2017. En los países nórdicos la erradicación de BVDV es

completa (al menos hasta mayo de 2018). El éxito de algunos programas llevó a las autoridades a cambiar los muestreos de algunos países, pasando de programas de control y erradicación al de vigilancia epidemiológica⁵⁸.

1.8.1. Impacto económico

El impacto en la producción relacionado al BVDV se debe a pobre desempeño reproductivo, abortos, retardo en el crecimiento, reducción en la producción de leche, sacrificio temprano, aumento de la mortalidad en terneros e incremento en la susceptibilidad a infecciones secundarias.

Según un reporte publicado en 2017 basado en 44 estudios publicados en 15 países en los últimos 30 años, el impacto económico es altamente variable dependiendo de las pérdidas directas e indirectas que se tienen en cuenta a la hora de hacer el estudio, pudiendo ascender hasta los 687,8 dólares por año y por animal. Entre los factores que dificultan las estimaciones están los precios de mercado a lo largo del tiempo, las asunciones del estudio particular, los factores de gestión del rebaño, la prevalencia de otras enfermedades, el período de cría, las granjas abiertas versus granjas cerradas, la tasa de reemplazo de hembras reproductoras, la vacunación y/o programas de control y erradicación, etc. Según este reporte las pérdidas directas promedio debidas a BVDV en los sistemas de producción de carne vacuna son un 20 % menores que en rodeos de producción lechera; en general, las pérdidas directas promedio por vaca lechera asciende a 199,50 dólares mientras que para vaca de producción cárnica es de 174,60 dólares por vaca y por año⁶¹.

En Argentina, según estimaciones del año 2013 el costo en un animal de tambo era $156 \pm 51,49$ dólares por vaca lechera en su ciclo anual reproductivo. En los establecimientos tipo *Feedlot*, la pérdida promedio estimada por animal es de 140 g/día/animal, considerando una ganancia promedio de 1200 g/día/animal⁶². Este tipo de producción asociado a hacinamiento de los animales y a inmunosupresión concomitante presenta un riesgo elevado de desarrollar infecciones secundarias bacterianas con manifestaciones clínicas, por lo que el uso de antibióticos debe tenerse en cuenta en el cálculo de los costos.

1.8.2. Situación de la enfermedad en Argentina

En Argentina, según relevamientos de INTA, la seroprevalencia arrojó valores que oscilan entre 32 % en el Noreste Argentino (año 2015), 74,3 % en Neuquén (año 2004) y hasta el 100 % en Chubut (año 2012)⁶². En la Cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires, se obtuvo una seroprevalencia individual aparente del 66 %, mientras que el 86 % de los establecimientos muestreados fueron clasificados como positivos, observándose una prevalencia intra-rodeo del 63,8 % (rango: 6,7-100 %) sobre un total de 1980 muestras provenientes de 99 rodeos⁶³.

En una publicación reciente se relevaron 56 rodeos provenientes de las provincias de Buenos Aires (n = 53), Santa Fe (n = 2), y Córdoba (n = 1) y se realizó un diagnóstico de RT-PCR anidada para genoma viral sobre un total de 2864 muestras, arrojando una positividad cercana al 1 %, mientras que alrededor del 20 % de los rodeos presentaban al menos un animal positivo (20 %)⁶⁴. Si bien el diagnóstico solo evaluaba presencia de antígeno viral, es presumible que la mayor parte de los diagnósticos positivos, correspondan a animales PI, dado el periodo de tiempo relativamente corto de detección de antígeno en animales transitando una infección aguda.

Según relevamientos no publicados de nuestro grupo sobre 16 tambos de la provincia de Salta, se muestrearon 40 animales por tambo, con un total de 640 muestras entre 2016 y 2018. La seroprevalencia fue muy variable, en muestras provenientes de 5 tambos fue 0 % y en otros 5 tambos fue del 100 %, dando un valor medio de 58,3 %. La presencia media de PI fue de 2,19 %. En estudios de genotipificación de BVDV provenientes de casos clínicos de la Pampa húmeda a partir de los laboratorios de diagnóstico de AZUL e INTA Balcarce (n = 30) y aislamientos de BVDV provenientes de lotes de suero fetal bovino (SFB) de la provincia de Buenos Aires (n = 50), el genotipo más abundante fue BVDV-1b con el 79 y 82 % respectivamente para cada tipo de aislamiento. El segundo genotipo más frecuente fue BVDV-1a con el 9 y 5 % respectivamente. El genotipo BVDV-2 tuvo una frecuencia relativa del 13 % en ambos tipos de aislamientos⁶².

1.9. Inmunopatogenia

Los virus tienen en general dos estrategias para propagarse en las poblaciones, pueden provocar infecciones agudas y producir contagios antes que el huésped logre inmunizarse, o bien causar una infección persistente. Los virus que provocan infección persistente cuentan con complejos mecanismos de evasión inmune, “se esconden” de la vigilancia del sistema inmunitario provocando infecciones lentas o latentes. Ejemplos de estas estrategias son utilizadas por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH, del inglés *Human*

Immunodeficiency Virus) o Herpes⁶⁵. El BVDV es único entre los virus causantes de infección persistente, dado que no desarrolla complejos mecanismos de inmunoevasión, sino que desarrolla inmunotolerancia, aun manteniendo altos títulos virales. Tanto las infecciones agudas como persistentes provocan inmunosupresión y predisposición a otras enfermedades del tracto respiratorio como Virus de Parainfluenza Bovina 3, Herpesvirus 1 Bovina, Virus Sincicial Respiratorio Bovino, o *Pasteurella haemolytica*. Se han descrito numerosos efectos producidos por el BVDV como decrecimiento en la linfoproliferación, incremento en la producción de prostaglandina E2, detrimento en actividad microbicida y migración errática de neutrófilos, acompañado de disminución de la secreción de inmunoglobulinas en la circulación, disminución de la expresión del complemento y receptores de la fracción constante (Fc) y en la producción de quimioquinas, quimiotaxis e inhibición de la formación de leucotrienos⁴⁹.

1.9.1. Inducción de apoptosis e IFNs

Peterhans y col. en el año 2003 han propuesto que la inducción en la producción de IFN-I por parte de M ϕ es clave en la persistencia viral, basándose en la observación de que solamente el biotipo ncp es capaz de establecer infecciones persistentes, y que en infecciones *ex vivo* de macrófagos (M ϕ) solamente el biotipo cp es capaz de inducir la formación de IFN-I⁴⁹.

Considerando que la muerte celular inducida por el biotipo cp del BVDV es mediada por apoptosis⁶⁶, los autores señalan además que la habilidad del BVDV ncp en evitar la apoptosis podría ser otro mecanismo de evasión inmune y que este mecanismo ocurre por la vía del ARN de doble cadena (ARNcd). La formación de ARNcd es un paso indispensable en la replicación de virus ARN y no se encuentra en células eucariotas no infectadas. Para demostrarlo, los autores trataron M ϕ y células de línea de riñón bovino (MDBK) con Poly IC, un ARN sintético de doble cadena inductor de apoptosis. Demostraron que la apoptosis inducida por este compuesto es abolida por la infección con el BVDV ncp. Sin embargo, el BVDV ncp no es capaz de evitar la apoptosis frente a otros inductores como actinomicina D o estaurosporina, ambos inductores de apoptosis por vías diferentes al ARNcd, demostrando que la apoptosis podría ocurrir por una vía dependiente de ARNcd la cual es neutralizada de forma específica por el BVDV ncp.

Es interesante señalar que la cantidad de ARN en células infectadas con el BVDV cp es mucho mayor que la cantidad presente en células infectadas con virus ncp. Los autores especulan con que la mayor parte de este ARN podría ser ARNcd induciendo tanto la producción de IFN-I como apoptosis, ambos atributos propios de cepas cp y que no se presentan en el biotipo

ncp⁴⁹. Otros autores encontraron que la proteína no estructural N^{pro} recombinante en células de línea porcina inhiben la apoptosis mediada por Poly IC¹⁴.

En células de línea de mamíferos Louis y col. han expresado la proteína viral NS3 con un vector adenoviral comprobando que por sí sola es capaz de inducir apoptosis correlacionada con la inducción de caspasas 8 y 9⁶⁷. Esta hipótesis es atractiva porque la proteína NS3 en forma libre se encuentra expresada constitutivamente durante todo el ciclo de replicación viral en cepas cp, mientras que en el biotipo ncp su producción se restringe a la infección temprana, para producir luego una forma no clivada de NS2-3²⁵.

1.9.2. Inmunopatogenia de la Infección persistente

El período ventana de la preñez donde el feto es susceptible para el establecimiento de la infección persistente podría explicarse por la capacidad del huésped de sintetizar, o ser sensible a, IFNs en el período crítico de establecimiento de la infección persistente. Durante la gestación temprana, la alta producción de IFN- τ por parte del trofoblasto bovino materno, podría explicar que no se establezca la persistencia en períodos tempranos. Este IFN de tipo 1 previene la luteólisis en el ovario de la vaca, y se sabe que tiene actividad antiviral⁴⁹. Para infecciones producidas después del día 120 de gestación ya habría inducción de IFNs por parte del feto. Recientemente Knappek y col. mostraron que los órganos linfoides fetales son capaces de inducir genes estimulados por IFN (ISG, del inglés *Interferon-stimulated genes*) en fetos en el día 190 de gestación⁴⁸.

Existen dos explicaciones alternativas para el establecimiento de la inmunotolerancia en animales PI, que no necesariamente son mutuamente excluyentes. Por un lado, se ha demostrado el BVDV inhibe la inducción de IFN-I *in vitro*, a través de las acciones de la ARNasa viral E^{ns} y N^{pro}. Este último degrada además al IRF3, inhibiendo la transcripción de IFN. La inhibición de la respuesta de IFN por N^{pro} y E^{ns} permite que BVDV persista y se replique en las células productoras de IFN *in vitro*. En un estudio *in vivo* Meyers y col. realizaron una infección intrauterina con BVDV mutante para los genes de N^{pro} y E^{ns} sin establecerse la infección persistente⁶⁸. Charleston y col. mostraron que fetos infectados con BVDV ncp durante la preñez temprana no inducen la síntesis de IFN, mientras que el biotipo cp (incapaz de establecer infección persistente) sí lo produce⁶⁹. No obstante, otros autores han encontrado que se induce una respuesta de inmunidad innata con producción de IFNs durante infecciones de fetos *in vivo* en el contexto de una infección persistente, aunque dicha respuesta no es lo suficientemente potente^{48,70-72}.

Una explicación alternativa sugiere que durante la génesis de la tolerancia central en el timo fetal, no se produce selección negativa de linfocitos autoreactivos porque los antígenos virales se encuentran en alta concentración y por ende, son reconocidos como propios, estableciéndose tolerancia central al BVDV⁴⁸.

Una vez que la infección persistente se encuentra establecida, el BVDV es resistente a los IFNs pero estos igualmente son capaces de establecer un estado antiviral frente a otros virus. Este modelo altamente selectivo de evasión del sistema de defensa de IFN es capaz de discriminar entre lo "propio" (entendiendo a la cepa causante de infección persistente como propia) y lo "ajeno", y puede ser un elemento clave en el éxito de la infección persistente, además de la inmunotolerancia iniciada en el momento temprano de la infección fetal⁷³. De este modo, la persistencia estaría relacionada tanto con la discriminación entre propio y ajeno por parte de elementos de la inmunidad innata, como resistencia a IFNs, así como a elementos de la inmunidad adaptativa, como la tolerancia central de células T y B.

No hay diferencia en conteo de linfocitos en animales PI de células TCD4, TCD8 y células B, frente a controles. En animales con MD se reportó un incremento de células B del 20 % en animales normales a 35 % y una disminución de linfocitos nulos (probablemente $T\gamma\delta$) del 50 %. Es interesante señalar que en linfocitos aislados de animales PI se desarrolla una respuesta de células TCD4 y TCD8 específica frente a BVDV, indicando que la persistencia no está relacionada con la presentación del antígeno. El mecanismo principal de tolerancia se debe a la tolerancia inducida por células TCD4. La especificidad de la tolerancia es muy alta, dado que animales PI pueden responder a cepas homólogas con cambios de un único aa. Esto puede explicar la aparición de anticuerpos activos frente a la cepa homóloga que resulta del surgimiento de cuasiespecies virales⁷⁴. Esta es una característica notable, dado que los virus presentes en infecciones persistentes presentan mayor tasa de mutación que aquellos provenientes de infecciones agudas⁷⁵. Sin embargo otros estudios señalan total ausencia de respuesta frente al repertorio de cuasiespecies virales presentes en el animal PI⁷⁶, por lo que es necesaria mayor investigación en el tema. Charleston y col. reportaron presencia de antígenos extracelulares que co-localizan con inmunocomplejos en los centros germinales de animales PI, sin detección de anticuerpos circulantes. Este descubrimiento supone la generación de respuestas de células B frente a la cepa infectante, que son sin embargo silenciadas por mecanismos de tolerancia⁷⁷. Se ha hipotetizado que la presencia de estos inmunocomplejos se debe a tolerancia incompleta de células B y la falta anticuerpos anti BVDV a una maduración incompleta de estas células y a una alta concentración de antígenos virales solubles⁵². Bruscke y col. realizaron una súper infección de animales PI con la misma cepa causante de la infección pero de biotipo cp, provocando el desarrollo de MD en la mitad de los

animales involucrados. Los que no desarrollaron la enfermedad presentaban niveles más altos de células $T\gamma\delta$ circulantes previo a la súper infección experimental. Estos animales sin embargo, presentaban lesiones similares a las inducidas por MD en abomaso, íleon y nódulos linfáticos mesentéricos. Esto llevó a los autores a especular con que la MD se da normalmente en edades superiores a 1 año, por la declinación fisiológica de las $T\gamma\delta$ ⁷⁸.

1.9.3. BVDV y células inmunes bovinas

1.9.3.1. Células presentadoras de antígeno

Las células presentadoras de antígeno (CPA) más potentes del sistema inmune innato son las células dendríticas (CD), seguidas por los $M\phi$ y los monocitos (Mo). Los receptores de la inmunidad innata reconocen PAMPs asociados a grandes grupos de patógenos diversos, estos incluyen ARNcd viral, mananos de la pared celular de levaduras, lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, péptidos formilados, lipopéptidos, peptidoglicanos y ácido teicoico de bacterias. Estos PAMPs son reconocidos por los receptores de patrones moleculares (PRR, del inglés *pattern recognition receptors*). Los PRR se encuentran en la superficie celular, en los endosomas y en el citoplasma. Entre estos PRR están los receptores de membrana citoplasmática o endosomal tipo toll (TLR, del inglés *toll-like receptors*), los receptores de lectinas tipo C y los receptores citoplasmáticos tipo NOD y tipo RIG-1.

Durante la infección con el BVDV los $M\phi$ y Mo ven alterados sus PRR, incluida la señalización a través de los TLRs^{79,80}. En CPA infectadas por BVDV se encuentra afectada la fagocitosis, observándose disminución en la expresión de receptores Fc y C3, los cuales son necesarios para la fagocitosis del antígeno⁵². El antígeno debe ser fagocitado y digerido en péptidos más pequeños, para ser presentado en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de clase II. Luego del reconocimiento del antígeno en el MHC-II por el receptor de la célula T se requiere una segunda señal de activación. Esta puede provenir de la citoquina interleuquina (IL) IL-12 o correceptores de la familia B7 como (B7-1/CD80 B7-2/CD86).

Resultados previos de nuestro grupo demostraron que el BVDV infecta CD demorando transitoriamente la presentación del antígeno⁸¹. Sin embargo, Glew y col. no encontraron diferencias en la presentación en CD⁸⁰. El efecto sobre las CPA parece depender largamente de la cepa infectante y la madurez de la CPA, siendo en general, los Mo los más afectados, y las CD las menos afectadas⁵². Las CD foliculares son longevas y tienen la capacidad de atrapar

antígenos y retenerlos en forma nativa en su superficie, constituyendo una gran reservorio de virus extra celular para virus como VIH, BVDV, priones, entre otros⁸².

1.9.3.2. Células T

Las infecciones con el BVDV tienen un impacto principal en los linfocitos del timo y los linfocitos foliculares. En un trabajo previo de nuestro grupo se realizó una infección experimental con dos cepas ncp de genotipo 2 de diferente virulencia. Ambas cepas indujeron leucopenia que se prolongó hasta 15 días, dependiendo de la virulencia de la cepa infectante²². Brodersen y col. realizaron una infección experimental con la cepa ncp NY-1, causando depleción de linfocitos TCD4 y TCD8 en el timo y de células B en las placas de Peyer⁸³. Teichmann y col. indujeron MD en infecciones experimentales en terneros, observando cambios estructurales en Placas de Peyer y depleción masiva de células T⁸⁴. Otros reportes de Infecciones experimentales con cepas de baja virulencia indujeron bajos niveles de depleción en el timo, en los folículos de las amígdalas y las placas de Peyer, viéndose repoblados dentro de los 12-15 dpi, sugiriendo una relación entre virulencia de la cepa infectante y depleción⁵².

En un modelo de infección experimental intra-bronquial con una cepa cp donde se realizó una infección y se repitió 31 días después, se observó un incremento de hasta 200 veces en el número de linfocitos broncoalveolares (BAL) para el día 10 post infección⁸⁵. Este trabajo se contrapone al resto de los reportes donde la infección provoca leucopenia. No obstante se utilizó una cepa cp que no es lo que ocurre en infecciones a campo. La leucopenia puede suponer otro factor predisponente a infecciones secundarias y al entorpecimiento de la respuesta inmune adaptativa.

Para comprender el rol de los distintos subconjuntos de células T en respuesta a la infección con el BVDV, Howard y col. depletaron las distintas subpoblaciones de células T con anticuerpos dirigidos contra TCD4, TCD8 y $T\gamma\delta$ en distintos grupos experimentales de terneros, de modo que a cada grupo le faltara una subpoblación de células T, para estudiar así el impacto de la infección con el BVDV en estos animales. Luego se determinó viremia y excreción viral. La excreción viral aumentó en el grupo TCD4 negativo mientras que en los grupos TCD8 y $T\gamma\delta$ no hubo efecto distinto a los controles, revelando un papel importante de las células TCD4⁸⁶. En otro estudio con un candidato vacunal se determinó que esta subpoblación también es la que produce IFN- γ , mientras que las CD8 no lo producen⁸⁷.

Se han realizado ensayos de linfoproliferación con la subpoblación TCD4 contra las proteínas virales NS2-3, NS3, E2, C, E^{rns} y N^{pro}, demostrando que las células TCD4 juegan un papel

importante en respuestas de memoria frente a esos antígenos virales. Los animales que fueron infectados con cepas cp, presentan una respuesta de 2 a 5 veces más potente que aquellos infectados con cepas ncp. Estos resultados indican que las cepas ncp tienen una respuesta inmune celular menos importante y con mayor producción de anticuerpos, frente a la respuesta Th1 inducida por cepas cp. Este tipo de respuesta se caracteriza por alta actividad de IL-4 y alta producción de factor estimulante de células B. Las células T de estos animales presentan baja IL-2 y baja producción de IFN- γ . Esta caída en la producción de IFN- γ inducida por la infección de BVDV, provoca una merma en la inmunidad celular en respuesta a *Mycobacterium bovis*, lo que puede ocasionar falsos negativos en el test diagnóstico de IFN- γ de tuberculosis. En CMSP infectadas con cepas cp también se tiende a inducir alta producción de IL-2 y aumento en su receptor (IL2R) lo que también se relaciona con una respuesta Th1, frente a ningún aumento inducido por la infección de BVDV ncp⁵².

El rol de las células T $\gamma\delta$ en la infección con el BVDV no se encuentra muy estudiado. En rumiantes estas células son más numerosas que en otros mamíferos llegando a representar hasta el 60 % de los linfocitos en los neonatos. La proporción decrece con el desarrollo del animal, representando un 30 % en el año de vida y un 10 % en animales adultos. Su función se relaciona más con las de las células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*) de la inmunidad innata. Un estudio sugiere que serían importantes en el control de la MD en animales PI⁷⁸

En cuanto al papel de las células TCD8, en ganado seropositivo las células CD8 producen IL-2 e IFN- γ hasta 9 meses después de la infección. No obstante, su número es pequeño, dado que se requieren cultivos prolongados en ensayos de linfoproliferación para detectarlas⁵².

Otro estudio examinó el efecto de una vacuna pentavalente en terneros de 3 grupos etarios con anticuerpos maternos frente al BVDV. Los 3 grupos desarrollaron respuestas protectoras frente al desafío 3 meses después. La respuesta fue de células TCD8, TCD4 y T $\gamma\delta$. No se detectaron anticuerpos circulantes en ningún animal⁸⁸.

1.9.3.3. Células B y anticuerpos

Los ensayos que analizan la variación en el número de células B circulantes son muy variables dependiendo de la cepa utilizada. En el mismo modelo de infección intra bronquial con cepa cp previamente citado, el aumento de células B en el espacio BAL aumentó hasta 100 veces tras segundo desafío⁸⁵.

En general con cepas ncp de alta virulencia ocurre depleción importante de linfocitos B en nódulos linfáticos y en placas de Peyer, observándose esto último también en el contexto de la MD. Los M ϕ positivos para BVDV y células estrelladas son predominantes en estos folículos depletados de células B. Hay también un aumento de la proliferación de células B dentro del área cortical del nódulo linfático en las primeras etapas de infección, por tanto, la caída en el número de linfocitos no es por falta de proliferación sino por un exceso de apoptosis⁵². Estos M ϕ y células estrelladas podrían estar involucrados en la depleción de células B, no obstante presentaron niveles muy bajos de TNF- α e IL-1 β , 2 conocidos mediadores proapoptóticos⁸⁹.

La presencia de anticuerpos neutralizantes aparece más pronto y más potente inducida por infección por cepas ncp que por cepas cp. Puede existir excreción viral por fluidos nasales aun en animales con anticuerpos en suero frente al mismo virus. Un estudio de 5 años indicó un aumento de 5 a 7 veces en el título de anticuerpos neutralizantes frente a BVDV 1 y 2, pero la incidencia de la enfermedad no decreció en ese periodo, indicando una capacidad limitada en el control de la enfermedad⁹⁰.

En un estudio con 20 terneros alimentándose con calostro con anticuerpos frente al BVDV, los animales tardaron 5.5 ± 1.7 y 6.1 ± 1.6 meses en volverse seronegativos para BVDV-1 y BVDV-2 respectivamente⁹¹. Los anticuerpos calostrales son capaces de bloquear por completo la detección del virus, incluso en animales PI. En estos, la seronegatividad llega mucho antes que en los animales no infectados, no detectándose anticuerpos neutralizantes frente al virus entre las 4 y 5 semanas⁵⁹.

1.10. Los macrófagos

Los M ϕ , junto con los Mo sanguíneos y las CD, comprenden un linaje de células mononucleares que se origina a partir de progenitores mieloides comunes. Durante el desarrollo normal y en varios procesos fisiopatológicos, los M ϕ residentes en tejidos se diferencian en gran medida a partir de los Mo circulantes y se auto-renuevan localmente a partir de M ϕ de origen embrionario⁹². Los M ϕ se distribuyen ampliamente en el organismo, donde se reúnen con células de diferentes tejidos y reciben distintos nombres de acuerdo a su ubicación anatómica, como microglia en el cerebro, células de Langerhans en la dermis, células de Kupffer en el hígado, M ϕ alveolares en los pulmones, etc⁹³.

Los M ϕ son células centrales de la inmunidad innata que orquestan diversos procesos ontogénicos, fisiológicos y patológicos de carácter infeccioso y no infeccioso. Se caracterizan por presentar una considerable diversidad y plasticidad, realizando funciones de defensa del

huésped e inflamación, funciones de reparación y remodelación del tejido. El descubrimiento inicial de los M ϕ se centró en su actividad fagocítica, que es importante para la defensa del huésped contra la infección y para el mantenimiento de las funciones de "limpieza", como la eliminación de células apoptóticas y la remodelación de la matriz extracelular. La acumulación de datos ha revelado que los M ϕ desempeñan un papel valioso en la ontogenia, el metabolismo sistémico, la adaptación al frío, la homeostasis y el desarrollo de los tejidos, la patología de la inflamación crónica, el cáncer, los trastornos cardiometabólicos y la neurodegeneración⁹⁴.

Las principales actividades biológicas de los M ϕ además de la fagocitosis, incluyen la presentación de antígenos y la producción de moléculas antibacterianas y enzimas que remodelan la matriz extracelular. Los M ϕ atraen y activan a otras células del sistema inmunitario adaptativo, en particular las células T a los sitios de inflamación. Además, los M ϕ son poderosos productores de citoquinas y quimioquinas que están involucradas en la respuesta inmune y el inicio de la inflamación. Finalmente, los M ϕ pueden detectar el momento en que finaliza una lesión y, por lo tanto, iniciar el proceso de resolución de la inflamación y el control de la fase de curación, restableciendo la homeostasis⁹⁴.

1.10.1. Perfiles de macrófagos

Los M ϕ responden a las señales presentes en el microambiente tisular, (por ejemplo, productos microbianos, señales de daño celular, linfocitos activados, etc.) adquiriendo distintos fenotipos funcionales. Los M ϕ pueden experimentar una activación clásica M1 (respondiendo a señales proinflamatorias, ligandos de TLR, IFN- γ), o bien activarse alternativamente como M ϕ -M2 (respondiendo a IL-4, IL-13, IL-10)⁹⁵.

El fenotipo M1 se caracteriza por la expresión de altos niveles de citoquinas proinflamatorias, altos niveles de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y del nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*), inducción de la respuesta Th1, actividad microbicida y tumoricida. En contraste el perfil M2 está involucrado en la respuesta antiparasitaria, remodelación del tejido, progresión de tumores y funciones inmunoregulatorias. Se caracterizan por tener aumentada la actividad fagocítica, alta expresión de receptores carroñeros (conocidos como "scavenger", del inglés), receptores de manosa y galactosa, producción de ornitina y poliaminas a través de la vía arginasa. Las señales como IL-10, hormonas glucocorticoides, y moléculas liberadas por células apoptóticas, inducen también perfiles fenotípicos que se encuentran dentro del espectro M2⁹⁵.

La plasticidad y la flexibilidad son características clave de estas células. La evolución de la fisiopatología se asocia con cambios dinámicos en los M ϕ , desde un perfil funcional proinflamatorio M1 de eliminación del patógeno, hacia un perfil M2 asociado a la remodelación del tejido y restablecimiento de la homeostasis⁹⁵. Aun no es claro si estos mecanismos de cambios son producto del reclutamiento de precursores monocíticos circulantes, o bien si se trata de la educación de las células *in situ*. Recientemente se ha sugerido que las células T especializadas o polarizadas también exhiben cierta flexibilidad y plasticidad⁹⁵.

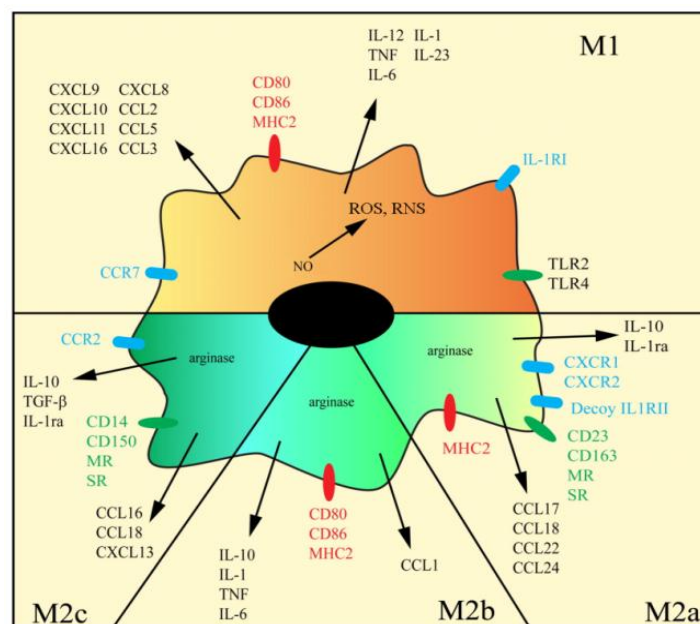


Figura 6. Representación esquemática de los perfiles funcionales de M ϕ . Los M ϕ activados clásicamente M1 son inducidos por LPS o agonistas de TLRs. El repertorio inflamatorio se caracteriza por la secreción de mediadores proinflamatorios y la liberación de ROS y RNS. En contraste, la activación alternativa de M ϕ M2 cubre un espectro continuo cuyo común denominador es la actividad arginasa. Tomado de Benoit y col.⁹⁶.

Es importante destacar que la concepción sobre la polarización de M ϕ ha ido cambiando en el tiempo. Mills y col. en el año 2000 fueron los primeros en proponer los perfiles funcionales de activación clásica M1 en M ϕ proinflamatorios y un perfil de activación alternativa M2 con funciones de reparación y remodelación del tejido, emulando la conocida clasificación Th1 y Th2⁹⁷. Desde entonces, y con el aporte de nuevos datos, el panorama se fue complejizando cada vez más, al punto de que se habla de M ϕ M3, M4 y M5 cada cual con diferentes subtipos y particularidades de cada tejido⁹⁸⁻¹⁰⁰. Además, los diferentes tipos de tumores tienen M ϕ asociados específicos, con un perfil inmunosupresor que promueven su crecimiento¹⁰¹. Hoy está claro que los M ϕ M1 y M2, representan los extremos de una realidad compleja y hay

quienes proponen una revisión exhaustiva de la clasificación M1-M2¹⁰², o bien, abandonar por completo este paradigma¹⁰³. No obstante, aún se sigue utilizando esta clasificación y es útil para entender el perfil funcional de los M ϕ , independientemente de las particularidades del tejido o el estado fisiopatológico.

La expresión de citoquinas y marcadores en los perfiles definidos como M1 y M2, también es variable en distintos trabajos. Dado que la actividad arginasa y la producción de óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) compiten por el mismo sustrato, y que las rutas se inhiben mutuamente, existe cierto consenso en la utilización de la producción de NO y la actividad arginasa como marcadores comunes que definen netamente el perfil M1 y M2 respectivamente, independientemente del subtipo dominante^{96,104–107} (**Figura 6**).

Una red de moléculas de señalización, factores de transcripción, mecanismos epigenéticos y reguladores post-transcripcionales subyace a las diferentes formas de activación de M ϕ . Las vías de señalización canónica Transductor de Señal y Activador de Transcripción (STAT, del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*) y del IRF son activadas por IFNs y TLRs hacia el fenotipo M1 a través de STAT1/STAT1 o por IL-4 o IL-13 a través de STAT6/STAT6. Los M ϕ -M1 aumentan positivamente IRF5 el cual es esencial para la inducción de citoquinas proinflamatorias como IL-12, IL-23 y TNF- α , responsables de respuestas Th1 y Th17. El homodímero STAT6, activa los típicos genes M2 como el receptor de manosa. IL-10 activa el fenotipo tipo-M2 a través de la vía STAT3⁹⁵.

Además de estas vías canónicas se ha visto que los IFN-I pueden inducir el estado M2 a través de STAT3/STAT3 y STAT6/STAT6. Sang y col⁹². proponen que los M ϕ podrían tener una regulación dinámica de la proporción relativa de proteínas STAT correspondientes a su ubicación tisular y fenotipos funcionales, y que los IFN puedan desempeñar un papel dual en la polarización M1 y M2, así como para la inducción del estado antiviral. Teniendo en cuenta la estimulación antiviral canónica y todas las demás vías de señalización que conducen a las características típicas de M1 y M2, los autores proponen un estado de polarización mediado por IFN-I, que daría como resultado un estado antiviral correspondiendo con una forma operativa relativamente independiente de los estados M1 o M2.

1.10.2. Macrófagos y su implicancia en la inmunopatogenia

La activación de M ϕ se ha reportado en enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En lupus eritematoso sistémico se ha demostrado que el defecto en la fagocitosis de células apoptóticas, activación aberrante y desbalanceo de activación de M ϕ participan en la

patogénesis¹⁰⁸. En artritis reumatoide, la principal fuente de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-12p70) proviene de los M ϕ sinoviales de las articulaciones, cuyo número correlaciona con la severidad de la enfermedad inflamatoria⁹⁵.

Los M ϕ -M1 son generalmente considerados responsables por la resistencia contra los patógenos intracelulares *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, así como las etapas tempranas de infección con *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans* y *Mycobacterium avium*. La inflamación descontrolada provocada por el perfil M1 asociada con la infección con *Escherichia coli* o *Streptococcus* sp. causa gastroenteritis, infecciones del tracto urinario, meningitis neonatal y sepsis. El cambio entre M1 y M2 observado durante la transición de infección aguda a crónica, puede favorecer a patógenos que desarrollaron estrategias para interferir con la actividad microbicida. La inflamación crónica y la formación de granulomas se caracteriza por la formación de M ϕ con morfología epitelial que se fusionan, dando lugar a células gigantes multinucleadas (CGM). Es probable que la regulación positiva de E-cadherina, que participa en la adhesión homotípica entre células esté involucrada en la formación de CGM. La función de las CGM continúa sin establecerse⁹⁵.

La inflamación relacionada con el cáncer se caracteriza por el reclutamiento del linaje monocítico al tejido tumoral, lo cual condiciona el nicho pre-metastásico. Los M ϕ -M1 tienen actividad antitumoral. En varios modelos de carcinogénesis en ratones, la asociación del tumor se ve favorecida por el cambio de M1 a M2, promoviendo un ambiente angiogénico de remodelación y crecimiento del tejido. Se ha reportado que la activación de M ϕ a través de Th1 contribuye a la eliminación de hepatocitos senescentes que de subsistir provocan carcinogénesis. Es probable que los M ϕ activados M1 contribuyan a la eliminación y a fases de equilibrio durante el progreso del tumor. En estadios tardíos de tumores en ratones y humanos los M ϕ asociados a tumores (TAMs, del inglés *Tumor Associated Macrophages*), normalmente tienen un perfil tipo M2, con alta expresión de IL-10, baja IL-12 y baja actividad tumoricida. No obstante, distintos perfiles pueden coexistir en un mismo tumor. Los linfocitos son orquestadores de las funciones de los TAMs, pero las vías de regulación difieren en tumores originados en distintos órganos. Por ejemplo, un detrimento en la función M1 se observó en el cáncer de piel, y esta es mediada por la producción de IL-4 por células Th2. Los fibroblastos pueden también promover polarización hacia M2 de los M ϕ . Los productos de células tumorales incluyendo componentes de la matriz como IL-10, CSF-1, y quimioquinas (CCL2, CCL18, CCL17, and CXCL4), moldean a los M ϕ hacia un perfil M2, promoviendo el crecimiento del tumor⁹⁵. Si las células no sufren un entranamiento anamnésico, los fenotipos polarizados son reversibles tanto *in vitro* como *in vivo*. En un ensayo clínico en pacientes con

cáncer ovárico, el tratamiento con IFN- γ activó la función tumoricida en TAMs provocando evidencia inequívoca de respuesta clínica¹⁰⁹. En un modelo de adenocarcinoma ductal pancreático, anticuerpos agonistas de CD40 promueven un efecto notable antitumoral aumentando la expresión de marcadores M1 (MHC-II y CD86) en M ϕ ¹¹⁰.

En infecciones experimentales con parásitos se observa que los M ϕ generalmente transitan un cambio dinámico hacia M2. La infección temprana con *Taenia crassiceps* se caracteriza por presencia de M ϕ -M1 impulsado por células Th1, mientras que la infección tardía se caracteriza por un perfil M ϕ -M2 dirigido por IL-4. Una dinámica similar de cambio hacia M2 se ha descrito también en la infección por *Schistosoma mansoni* y *Trypanosoma congolense*. En la infección crónica por *T. crassiceps* la subunidad p50 de NF- $\kappa\beta$, promueve el perfil protector M2 asociado a la caída de carga parasitaria. La asociación entre el perfil M2 no implica necesariamente una relevancia en la patogénesis⁹⁵. Por ejemplo, en ratones deficientes para el receptor de IL-4 α la infección con *S. mansoni*, se ve agravada, pero no hay efecto en la infección por *Nippostrongylus brasiliensis*¹¹¹.

1.10.3. Macrófagos e infecciones virales

Los virus deben afrontar varios desafíos para no desaparecer. Una vez que ingresaron al huésped deben infectar células permisivas, evitar la respuesta inmune, replicar sus genomas y persistir, generando mecanismos para infectar un nuevo huésped. Para constituir un reservorio viral las células deben cumplir las siguientes características: tener una vida lo suficientemente larga para permitir la replicación, ser capaces de evitar la apoptosis y la respuesta inmune, y tener interacciones con otras poblaciones celulares. Algunas células tienen estas características de manera inherente, pero otras pueden transformarse y adaptarse mediante una infección viral. Los Mo por definición son células que no se dividen, con una vida media corta que causa una replicación viral generalmente deficiente. Los Mo se diferencian continuamente de precursores de médula ósea y entran en la circulación donde pueden exponerse a partículas virales. Presentan un amplio repertorio de receptores en la superficie celular y alta actividad fagocítica, que puede ser aprovechada por los virus⁹⁴.

De acuerdo con un programa genético interno, después de tres días de circulación en los vasos sanguíneos, los Mo pueden diferenciarse en M ϕ tisulares o seguir la programación biológica y sufrir apoptosis. Los virus pueden modular la apoptosis y prolongar la vida de la célula para evitar la degradación y replicarse de manera efectiva en un organismo. Provocan cambios en la polarización celular, ocultan receptores virales de la superficie celular y alteran la expresión de

quimioquinas/citoquinas, lo que dirige la diferenciación celular hacia M ϕ de larga vida, favoreciendo la migración a los tejidos donde se convierten en células residentes infectadas. Este es el modelo conocido como “Caballo de Troya”, otorgándole a los virus la posibilidad de diseminarse a través de todos los órganos y tejidos, incluido el cerebro, formando reservorios estables y duraderos que pueden incrementar la producción de nuevas partículas virales en condiciones favorables para la reactivación⁹⁴.

Los M ϕ pueden entonces interactuar activamente con otras poblaciones celulares a través de contactos directos de célula a célula, proporcionando una base para la diseminación del virus⁹⁴. Además, los Mo/M ϕ pueden estar involucrados en la transmisión vertical del virus de una madre infectada al feto en desarrollo en el útero, como es el caso BVDV, o del virus Zica, otro representante de la familia *Flaviviridae*¹¹².

1.10.3.1. Mecanismos de entrada de los virus a los Macrófagos

Después del contacto inicial con la superficie celular, los virus pueden penetrar en la célula a través de endocitosis, fagocitosis, macropinocitosis o fusión de membranas. Se puede suponer que la vía de captación y el tipo de receptores involucrados son el primer paso de adaptación necesario para la supervivencia próspera de los virus. La endocitosis es una forma de transporte de moléculas mediada por clatrina que se inicia tras la unión del virus con un receptor celular. La fagocitosis es un tipo de endocitosis que implica la formación de vesículas dependientes de actina. La macropinocitosis es un proceso endocítico de captación no selectiva de líquido extracelular, que puede inducirse tras la activación de las vías de señalización del factor de crecimiento y también puede ser aprovechado por varios virus⁹⁴.

Los receptores y las proteínas involucradas en las interacciones virus-huésped definen los próximos pasos del ciclo de vida viral. Para la entrada mediada por receptores, los virus pueden emplear receptores no específicos, donde un virus accede a una amplia gama de poblaciones celulares, o bien presentar interacciones altamente específicas entre el virus y los receptores de la superficie celular. Esta estrategia a menudo está acompañada por procesos de inmunomodulación, donde un virus infecta un conjunto limitado de células diana; determinando el tropismo de la infección viral. Varios virus utilizan receptores clásicos y proteínas transmembrana que están ampliamente representadas en las células y no están restringidas a la población de Mo/M ϕ permitiendo que los virus infecten una amplia gama de células blanco⁹⁴.

Los ácidos siálicos están altamente conservados y son abundantes en prácticamente todas las células, lo que los convierte en un receptor viral frecuente. El RSV utiliza las glicoproteínas de hemaglutinina en su superficie para unirse directamente a los ácidos siálicos de los eritrocitos como un primer paso de la interacción del virus que ayuda a evitar la respuesta inmune y permite la propagación dentro del organismo. Varios virus como el VIH, Citomegalovirus (CMV) y RSV entre otros utilizan proteoglicanos de sulfato de heparán, que se consideran como un receptor de superficie celular no específico en función de sus interacciones con los motivos positivos de las proteínas virales. El sulfato de heparán participa ayudando tanto a la unión como a la entrada viral. La fosfatidilserina juega un papel valioso en la señalización del ciclo celular, específicamente en relación con la apoptosis. En la membrana viral, la fosfatidilserina imita los fragmentos de membrana generados durante la apoptosis celular, lo que conduce al reconocimiento de M ϕ y la internalización por macropinocitosis, que luego conduce a su infección y permite el escape inmune. La redundancia y la conservación de los receptores determina el tropismo viral, la propagación y la patogenia de la enfermedad⁹⁴.

Otros virus se unen a cofactores específicos: VIH utiliza CD4 y correceptores CXCR4/CCR5 o receptor de manosa humana tipo C1 (hMRC1, del inglés *human Mannose Receptor C-type 1*) e integrinas $\beta 1/\beta 3$ y TLR3/TLR9 para CMV. La captación de VIH-1 mediada por hMRC1 por los M ϕ no conduce a una infección productiva en estas células, pero facilita la transmisión del virus a las células T, lo cual es importante para la diseminación del virus y el establecimiento de la infección. Además del escenario de entrada clásico que utiliza receptores de la superficie celular y la posterior endocitosis, macropinocitosis o fusión de membranas para la entrada a la célula, algunos virus infectan M ϕ a través de la fagocitosis de M ϕ apoptóticos que fueron previamente infectados por ese virus⁹⁴.

1.10.3.2. Modulación de los macrófagos promovidas por infecciones virales

La capacidad de los M ϕ para establecer la inflamación y restituir la homeostasis puede ser modulada y utilizada por los virus para propagar y establecer la infección. Los virus pueden utilizar la programación inflamatoria tanto aguda como crónica de los M ϕ para su diseminación, replicación y supervivencia. Las células polarizadas M1 son susceptibles a los virus y reclutan otras poblaciones celulares al sitio de la inflamación, lo que favorece la transmisión y diseminación del virus. Por el contrario, los M ϕ -M2 están involucrados en enfermedades crónicas y aseguran la permisividad y la distribución tisular de los virus,

formando un reservorio de infección de por vida capaz de activarse y reponerse en condiciones propicias⁹⁴.

En general, los virus monocitotrópicos han desarrollado dos mecanismos para evitar respuestas inmunitarias potentes mediadas por la polarización adecuada de los M ϕ . El primero es adaptarse directamente a la polaridad favorable existente de la activación de los M ϕ y el segundo es modular activamente el estado desfavorable de la polarización de los M ϕ ⁹². De acuerdo con los intereses del huésped lo conveniente sería promover una respuesta de M ϕ -M1 o M ϕ -antivirales, lo cual conlleva la capacidad de inactivar al virus y la activación de una respuesta inmunitaria secuencial efectiva. Con frecuencia los virus desarrollan estrategias para promover el perfil M2. Una manera de lograrlo es mediante la citoquina reguladora IL-10. Se ha demostrado que varios virus aumentan la expresión de IL-10 del huésped. Otros virus más autónomos como herpesvirus, aloherpesvirus y el virus de la viruela codifican una proteína funcional ortóloga de IL-10, llamada IL-10 viral⁹².

Stevenson col.¹¹³ plantearon una hipótesis para el CMV humano (HCMV, del inglés *Human Cytomegalovirus*) en la modulación de Mo/M ϕ según la cual, el virus promueve un tipo de célula "finamente afinado", donde los Mo/M ϕ existen en algún lugar a lo largo del continuo M1/M2 que se necesita para la propagación, replicación y persistencia viral. El HCMV impulsa la expresión simultánea de moléculas asociadas a M1 (IL-6, TNF- α , CD86) y a M2 (IL-10 y CD163). El HCMV probablemente emplea marcadores y quimioquinas asociados a M1 para promover la activación proinflamatoria de M ϕ infectados. Esto asegura una elevada motilidad celular, migración y reclutamiento de Mo. Al mismo tiempo, el HCMV utiliza marcadores de M ϕ y quimioquinas asociados a M2 para silenciar los efectos dañinos para los tejidos de la respuesta proinflamatoria y cualquier posible respuesta antiviral⁹⁴.

Otro ejemplo de diseminación viral por M ϕ ocurre con el virus del Zika, en M ϕ de la placenta humana, llamados células de Hofbauer. El virus se replica en los M ϕ durante al menos 96 horas después de la infección *in vitro*, lo que conduce a una inducción mínima de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y expresión de genes antivirales, con una muerte celular mínima. Como resultado se observa una respuesta inmunitaria débil que prolonga la infección del virus y la persistencia en los tejidos. Los M ϕ infectados muestran una fuerte activación del Factor Inhibidor de la Migración, lo que conduce a una mayor capacidad de migración de las células infectadas y puede aumentar la capacidad del virus para promover su diseminación y cruzar la barrera placentaria⁹⁴.

Todas estas evidencias muestran que los virus manipulan la biología celular de los Mo/M ϕ para utilizarlos como vehículo para la diseminación, promover la persistencia a largo plazo dentro de los tejidos infectados y permitir la replicación del virus en condiciones favorables⁹⁴.

Una estrategia típica de los virus altamente patogénicos es la de promover un perfil M1 asociado con una potente inflamación, lo cual promueve la diseminación viral, a través de los linfocitos y Mo reclutados y causa muerte celular masiva a través de la infección. Este es el caso de SARS-Cov2 asociado a la producción de la comúnmente denominada “tormenta de citoquinas”¹¹⁴. Este estado de “superinflamación” de los M ϕ probablemente acabe provocando más daño sobre los propios tejidos que ejerciendo una respuesta antiviral efectiva. Faltan estudios que den cuenta del auténtico fenotipo de estos M ϕ “superinflamados” y cuanto difieren de los típicos M ϕ -M1, no obstante parecen corresponder con la polarización Th17, la misma que se induce durante una infección con Micobacterias⁹².

Los M ϕ porcinos infectados por el Pestivirus CSFV mostraron un aumento en el marcador M2 arginasa-1 y una disminución en la producción de NO, lo que indica una polarización M2. A este respecto, la infección en M ϕ por el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV, del inglés *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*), estimuló la producción de IL-10 y el fenotipo de M ϕ del espectro M2. En particular, el estado mediado por IL-10 fue significativamente más permisivo a la infección por PRRSV⁹².

Resumiendo, los virus monocitotrópicos pueden modular el fenotipo de los M ϕ mediante distintas estrategias, (i) induciendo depleción masiva de M ϕ , inflamación exacerbada promovida por “tormenta de citoquinas”, reclutamiento de células al sitio de infección y diseminación viral, (ii) Interferencia en el patrón de citoquinas secretado, promoviendo IL-4, IL-10 y otros mediadores anti-inflamatorios, o induciendo la secreción de IL-10 virales (iii) interfiriendo en la producción y señalización de IFNs e impidiendo el establecimiento del estado antiviral (iv) mediante la producción de micro-ARN que interfieren en el fenotipo de los M ϕ . La frecuente aparición de monocitotropismo en infecciones virales y los mecanismos virales relacionados en la regulación de la polarización de los M ϕ implican un papel esencial en la interacción virus-huésped y los resultados de la enfermedad⁹².

1.10.3.3. Macrófagos durante la preñez y el periodo neonatal

La vulnerabilidad a las infecciones virales es mucho mayor en los recién nacidos que en los adultos. Las infecciones virales adquiridas en etapas tempranas de la vida a menudo se asocian con una mayor tasa de replicación viral, un mayor riesgo de infección persistente (crónica) y una enfermedad más grave en comparación con las adquiridas en etapas posteriores de la vida¹¹⁵.

La inmunidad fetal y neonatal se adapta a la supervivencia intrauterina y facilita la protección postnatal contra patógenos extracelulares; sin embargo, existe una mayor susceptibilidad a los patógenos intracelulares como los virus. Durante la ontogenia se desarrolla una continua remodelación tisular y angiogénesis. Las células monocíticas fetales y neonatales tienen un fenotipo alternativo con mayor expresión de receptores carroñeros (CD36 y CD163) y receptores Fc (FcγRI y FcγRII), así como receptores de citoquinas/quimioquinas CD115, CD116 y CX3CR1, pero menor expresión de CCR2 y CCR5 que las células adultas homólogas. Con o sin estimulación mediante PAMPs, las células monocíticas neonatales producen niveles más bajos de citoquinas Th1, incluidas IFN-γ e IL-12 (que respaldan la eliminación de patógenos intracelulares), pero niveles más altos de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF-β. Sin embargo, el estímulo mediante PAMPs induce a las células fetales para que produzcan concentraciones adultas de IL-1β, IL-6 e IL-23, que favorecen la diferenciación de células Th17 y la eliminación de patógenos extracelulares¹¹⁵. Otros factores, como la adenosina y otras moléculas solubles en el plasma neonatal, parecen sesgar aún más este medio de citoquinas, que conduce a las células monocíticas hacia un estado tipo M2, vulnerable a la infección viral en los primeros años de vida⁹².

Los Mφ están presentes en todos los compartimentos materno-fetales, incluidos la placenta y el endometrio, y un embarazo exitoso requiere que el estado de activación de estos Mφ útero-placentarios permanezca regulado durante todo el embarazo¹¹⁵. Se ha reportado que los Mφ útero placentarios tienen un estado pro-M2 para facilitar el desarrollo fetal. La modulación de la polaridad de los Mφ por parte de agentes infecciosos puede afectar los resultados del embarazo¹¹⁵. En el caso de BVDV, como se mencionó antes, la infección persistente se establece en fetos en desarrollo, pero el papel de la polaridad de los Mφ en este contexto no ha sido estudiado.

Claramente, algunos virus son patógenos exitosos que han evolucionado para aprovechar el estado pro-M2 para establecer infecciones en algunos sitios inmunoprivilegiados, como el cerebro y la placenta; o para aprovechar ciertos procesos, como el desarrollo fetal⁹².

1.10.4. Macrófagos bovinos

El cultivo de Mφ bovinos *ex vivo* ha sido ampliamente utilizado por investigadores para estudiar su fenotipo y funciones. Se han purificado Mφ bovinos por canulación de vías linfáticas aferentes¹¹⁶, de la ubre¹¹⁷, de médula ósea¹¹⁸⁻¹²⁰, o de lavados alveolares¹²¹⁻¹²⁴. Estas técnicas son invasivas (purificación por las vías linfática), o bien conllevan a la muerte del

animal. La utilización de M ϕ -Mo es una técnica de elección ampliamente utilizada en cultivos primarios de M ϕ bovinos. Existen dos técnicas principales para purificar Mo que se describirán más adelante. Ambas técnicas purifican Mo bovinos de sangre periférica para luego diferenciarlos a M ϕ -Mo *ex vivo*^{116,125-131}. Se han descrito 3 poblaciones de Mo en bovinos basados en el balance de expresión de CD14 y CD16. Con Mo clásicos que representan casi el 90 % de la población de Mo circulantes (CD14⁺/CD16⁻), Mo intermedios (CD14⁺/CD16⁺) y Mo no clásicos (CD14⁻/CD16⁺). Se ha propuesto que los Mo abandonan la médula ósea como Mo clásicos y si permanecen en la circulación se diferencian a Mo intermedios¹³². Para la obtención de M ϕ -Mo bovinos, los Mo son cultivados por tiempos variables en presencia de distintos estímulos como por ejemplo el Factor estimulante de colonias de granulocitos y M ϕ (GM-CSF, del inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)^{133,134}, o bien GM-CSF, IL-4, y el ligando de tirosina quinasa 3 tipo FMS (Flt3L, del inglés *fms like tyrosine kinase ligand*)¹¹⁶, o se siembran en un medio rico aa¹³⁵, o bien se siembran sin ningún estímulo adicional^{136,137}. Montoya y col. caracterizaron exhaustivamente a M ϕ -Mo en sus condiciones de diferenciación y cultivo (GM-CSF, IL4, y Flt3L) como M ϕ de fenotipo MHCII⁺ CD11c⁺ CD11b⁺ CD205⁻ CD1b⁺ CD14⁺ CD172a⁺. Este fenotipo es muy similar, pero no idéntico a los denominados M ϕ *bona fide* extraídos de nódulos aferentes y sin ningún cultivo *in vitro*¹¹⁶.

Para emular distintos perfiles de M ϕ -Mo bovinos *in vitro* también se utilizan distintos estímulos. Por ejemplo, Düvel y col. purificaron M ϕ -Mo bovinos y los estimularon con IFN- γ seguido de LPS para producir M ϕ -Mo de fenotipo M1 y con IL-4 e IL-13 para emular M ϕ -Mo de un perfil M2¹¹⁷, otros utilizan GM-CSF e IFN- γ para inducir M ϕ M1, e IL-4 para inducir el fenotipo M2¹³⁸ o IFN- γ y/o LPS para inducir M ϕ -Mo M1, o bien IL4 e/o IL-13 para inducir un perfil M2¹³⁹.

La caracterización que se hace de los M ϕ bovinos, independientemente de su origen también es muy variable. Thirunavukkarasu y col. han utilizado a CD80, CD86 como marcadores M1 y CD163 como marcador M2¹²⁶. Düvel y col. encontraron que M ϕ -Mo perfilados como M1, muestran una caída en la expresión de CD163, mientras que los M ϕ perfilados como M2, no producen cambios en este marcador¹¹⁷. Hussien y col. utilizaron a CD163 y MHC-II como marcadores M2¹⁴⁰, mientras que en un estudio *in situ* con M ϕ bovinos tisulares de intestino con un fenotipo M2, se determinó que estos expresaban CD163 y CD206¹⁴¹. Curiosamente, Imrie y col. no detectaron cambios en la actividad arginasa y producción de NO (marcadores típicos M1 y M2, respectivamente) en M ϕ -Mo bovinos perfilados *ex vivo* con IFN- γ , LPS, IL-4 e IL-13, aunque sí detectaron cambios a nivel de la expresión génica¹³⁹.

Como puede verse, la vasta plasticidad fenotípica de los M ϕ , hace posible explorar muchas alternativas a la hora de producir y caracterizar distintos fenotipos de M ϕ *in vitro*, y el modelo bovino no es la excepción.

1.10.4.1. Antecedentes de estudio de BVDV en Macrófagos

1.10.4.1.1. Experimentos *ex vivo*

Los primeros trabajos de BVDV con M ϕ bovinos datan de 1994, del grupo del Dr. Peterhans y col. quienes utilizaron M ϕ bovinos derivados de médula ósea y realizaron infecciones *ex vivo* con cepas cp y ncp. Ambas cepas redujeron la producción de NO y TNF- α por parte de los M ϕ infectados. Descubrieron además un factor soluble secretado por M ϕ infectados solamente con el biotipo cp que era capaz de inducir apoptosis en M ϕ infectados o no infectados con el BVDV, en presencia de estímulos de origen bacteriano. Descartaron que la inducción de apoptosis fuera provocada por IFN-I y especularon con que estos factores solubles pueden cumplir un rol importante en la patogénesis de la MD^{119,120,142,143}. Recientemente, Chase y col. encontraron factores solubles en sobrenadantes de M ϕ -Mo infectados con una cepa ncp de BVDV de alta virulencia que provocaron una caída en la fagocitosis y la actividad bactericida de M ϕ -Mo. Además, estos factores regularon negativamente CD14 y MHC-II en los M ϕ -Mo, e indujeron apoptosis en linfocitos y en MDBK. Es interesante destacar que ninguno de estos efectos se observó en una cepa de baja virulencia. El factor de virulencia no fue identificado, sin embargo, no hubo diferencias en los ARNm de los mediadores proapoptóticos IL-1 β y TNF- α ni la citoquina proinflamatoria IL-6¹⁴⁴. Burr y col. exploraron el transcriptoma temprano de M ϕ -Mo adherentes infectados con la misma cepa de biotipo cp y ncp de BVDV. Encontraron que la cepa cp regulaba positivamente las familias de quimioquinas CCL and CXCL respecto al cultivo sin infectar, mientras que la cepa ncp mostraba el efecto contrario, regulando negativamente quimioquinas clave para una respuesta efectiva¹⁴⁵. Recientemente se reportó también la inducción de IL-1 β por parte de M ϕ -Mo adherentes infectados con una cepa cp¹⁴⁶. Estos resultados apoyan la idea que el biotipo cp no es tan eficiente como el ncp en provocar una inmunoevasión efectiva en el huésped dado que induce síntesis de IFNs y apoptosis en M ϕ ^{49,142,143}. Recordemos que el biotipo cp solamente se encuentra en el contexto de la MD, siendo incapaz de establecer una infección aguda en una situación natural²⁶. En los trabajos consultados solamente la cepa ncp de alta virulencia indujo apoptosis en linfocitos (aunque No en M ϕ) y en células de línea MDBK¹⁴⁴. Esta observación *ex vivo* fue también observada *in vivo*

por nuestro grupo, donde una cepa de alta virulencia provocaba una linfopenia mucho más pronunciada y extendida en el tiempo, que una de baja virulencia²².

También se ha reportado regulación negativa de CD14 (receptor de LPS) y fagocitosis inducidos por la cepa cp NADL en M ϕ -Mo adherentes infectados *ex vivo* respecto de los controles sin infectar, por lo que el biotipo cp, al menos en esta cepa, es capaz de provocar cierta inmunoevasión *ex vivo*¹⁴⁷.

Schaut y col. demostraron que en M ϕ -Mo-adherentes infectados con el BVDV indujeron una expresión diferencial de citoquinas proinflamatorias y que esto dependía del biotipo y la virulencia de la cepa infectante. Para el biotipo cp y ncp utilizaron la misma cepa que difería en una inserción entre las secuencias de NS2/3. Los genes analizados fueron *il1 β* , *tnf α* , *il6*, *il8*, *il12p40* e *il10*. El biotipo cp y la cepa de alta virulencia indujeron mayor expresión de todos los genes analizados. No obstante, cuando se evaluó la secreción de proteínas IL-1 β , IL-6, y TNF- α , solamente hubo diferencias en la secreción de IL-6, regulado positivamente por parte de la cepa cp, por lo que no siempre existe un correlato entre expresión de genes y secreción proteínas. Además, tras estimular a los M ϕ -Mo con agonistas de TLR2, TLR4, TLR6, TLR7 y TLR8 la secreción de TNF- α se vio reducida con todas las cepas y todos los TLR, con excepción de TLR7, lo cual probablemente tenga implicancia en la inmunosupresión observada tras infecciones bacterianas secundarias⁷⁹.

Jungi y col. analizaron la expresión de ARNm de TLR2, TLR3 y TLR4 en M ϕ -Mo adherentes infectados *ex vivo* con el BVDV. Mientras que las funcionalidades mediadas analizadas (expresión de TNF- α y producción de NO) se vieron afectadas por la infección, los ARNm de los TLR analizados no se vio afectada, sugiriendo una disociación entre las funciones mediadas por TLR y la expresión de estos ARNm¹⁴⁸.

1.10.4.1.2. Experimentos in vivo

Pedrerá y col. en el año 2009 utilizaron un modelo *in vivo* de Terneros Privados de Calostro (TPC), para investigar el mecanismo subyacente a la depleción masiva de linfocitos en las Placas de Peyer. Descubrieron que la muerte de linfocitos B estaba mediada por apoptosis y que la depleción estaba acompañada por un aumento importante de M ϕ en los folículos y en las áreas interfoliculares. Algunos M ϕ mostraban signos de infección viral y actividad secretoria y fagocítica, no obstante, en general presentaban valores muy bajos de TNF- α e IL-1 β , por lo que no se los podía relacionar directamente con la apoptosis de los linfocitos B foliculares⁸⁹. El mismo grupo realizó otro experimento en el mismo modelo *in vivo* de TPC,

explorando el rol de los M ϕ en el timo. Nuevamente hallaron que la depleción tímica de linfocitos era producida por apoptosis, y que estos linfocitos apoptóticos estaban infectados con el BVDV, aunque el número de linfocitos infectados permaneció bajo durante todo el experimento. En el timo también la depleción estuvo acompañada por un aumento considerable de M ϕ en corteza y médula y una caída en células productoras de TNF- α e IL-1 β . Además estos M ϕ presentaban alta actividad fagocítica, por lo que probablemente estuvieran fagocitando cuerpos apoptóticos provenientes de linfocitos infectados¹⁴⁹.

En otro experimento *in vivo* se estudió la respuesta de M ϕ alveolares a la infección con una cepa cp de BVDV. Se estudió la expresión de receptores Fc, expresión del receptor del complemento C3, fagocitosis, actividad microbicida y producción de factores quimiotácticos de neutrófilos. Todos los parámetros estudiados se vieron reducidos en M ϕ provenientes de los animales infectados¹⁵⁰. Por lo tanto la cepa cp también es capaz de provocar cierta inmunoevasión *in vivo* dado que interfiere con las funciones de los M ϕ alveolares.

Resumiendo, los aspectos más importantes que se recogen de la bibliografía consultada acerca de la interacción del BVDV con M ϕ bovinos, podemos destacar que las cepas ncp, que son las que circulan en el campo y tienen importancia epidemiológica, provocan alteraciones en las funciones de los M ϕ bovinos *ex vivo* e *in vivo*; sin embargo, no existe una evidencia que pueda establecer una relación clara entre depleción masiva de linfocitos y la actividad de M ϕ .

Es muy probable que estas alteraciones provocadas en la funcionalidad de los M ϕ , jueguen un papel importante en la inmunoevasión provocada por el BVDV y la posterior inmunosupresión observada *in vivo*.

1.11. Hipótesis

Con todo lo expuesto anteriormente, la actividad de M ϕ de distinto fenotipo y su posible relación con la inmunopatogenia provocada por el BVDV se encuentra inexplorada. Este trabajo de tesis se plantea, por lo tanto, las siguientes hipótesis:

- *El BVDV presenta un tropismo preferencial por células inmunes del linaje monocítico.*
- *Algunos fenotipos de M ϕ son más susceptibles a la infección por el BVDV.*
- *La capacidad del BVDV de modificar el fenotipo de los M ϕ podría guardar relación con la inmunopatogenia viral.*

Para contrastar estas hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1: Establecer el tropismo, la cinética de replicación del BVDV sobre CMSP y la expresión de citoquinas inducidas por la infección.
- 2: Estudiar la capacidad del BVDV de infectar M ϕ -Mo bovinos en cultivos primarios.
- 3: Establecer si existen diferencias en la cinética de replicación del BVDV en M ϕ -Mo bovinos de distinto fenotipo y en la inmunomodulación ejercida por el virus.
- 4: Determinar si el comportamiento del virus en los diferentes fenotipos de M ϕ guarda relación con la inmunopatogenia observada *in vivo*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Virus

La cepa de BVDV utilizada principalmente en este trabajo de tesis es la 98-124, de genotipo 2b. Corresponde a un aislamiento de la provincia de Buenos Aires de biotipo ncp caracterizado ampliamente *in vitro* e *in vivo* por nuestro grupo²². Otras cepas utilizadas se detallan en la **Tabla M1**.

Cepa	Genotipo/Biotipo	GeneBank	Publicación
NY-93	2/ncp	AF502399.1	Genoma completo Christiane Meyer y col. ¹⁵¹
NY-1	1b/ncp	L32879.1	5'UTR parcial Pellerin y col. ¹⁵²
98-124	2b/ncp	JX865428.1	E2 parcial Pecora y col. ¹⁵³ .
VS253	2a/cp	N/A	- Pecora y col. ¹⁵³ .
95409	1b/cp	JX848362.1	5'UTR Pecora y col. ¹⁵³ .
Singer	1a/cp	DQ088995.2	Genoma completo Jones y col. ¹⁵⁴

Tabla M1. Detalle y referencias de las cepas utilizadas en este trabajo.

2.2. Animales

Los animales utilizados en el experimento en bovinos y para la obtención de muestras de sangre para la purificación de células son de raza *Aberdeen Angus* y provienen del Campo Experimental del CNIA – INTA. Todos los animales utilizados eran libres BVDV y del Virus de la

Leucosis Bovina (BLV, del inglés *Bovine Leukemia Virus*) al momento de realizar el experimento, sin signología clínica de ningún tipo.

Los ratones BALB/c se adquirieron en el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la UBA. Los animales se entregaron con análisis bacteriológicos y parasitológicos negativos y se alojaron en el bioterio de la empresa Agropharma Salud Animal S.A. con sede en el partido bonaerense de Moreno, en condiciones de temperatura y humedad constantes y controladas (23 °C – 50 % respectivamente) y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas con disponibilidad de alimento y agua *ad libitum*. Las jaulas, el alimento y la viruta utilizadas fueron autoclavadas. Se permitió el aclimatamiento de los animales durante 10 días previos al inicio del experimento.

2.3. Células

2.3.1. Cultivos de líneas celulares y medios de cultivo

La línea epitelial MDBK (*Madin-Darby bovine kidney*) de riñón bovino proveniente de la ATCC (*American Type Cell Collection*) provista por el área de cultivos celulares del IVIT-CONICET, se utilizó fundamentalmente para propagar el BVDV, producir bancos de virus y para algunos ensayos *in vitro*. Esta línea crece en el medio MEMD (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco) suplementado al 10 % con SFB (Internegocios) (MEMDc). Para realizar los pasajes las células son lavadas y despegadas con tripsina ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,25 % (Invitrogen).

Derivada de esta línea MDBK se utilizó también la línea celular MDBKT2 cedida gentilmente por el Dr. Bryan Charleston (The Pirbright Institute) para la cuantificación de IFNs como se describirá más adelante^{155,156}.

Para propagar baculovirus se utilizó la línea celular de SF9 derivada de *Spodoptera frugiperda* y la línea SF9-GFP que emite fluorescencia al ser infectada por baculovirus. Ambas fueron cedidas gentilmente por el Dr. Oscar Taboga (Instituto de Biotecnología - CICVyA - INTA). Derivada también de la línea SF9 se utilizó la línea SF9-BIR para la producción de la proteína E2 recombinante (E2r) cedida gentilmente por el Dr. Diego Álvarez (Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional de San Martín (UNSAM)). Estas líneas utilizan el medio TNM-FH (Gibco) suplementado al 10 % (TNM-FHc) con SFB (Internegocios). Para realizar pasajes se elimina el sobrenadante y se golpea la botella suavemente con las manos para despegarlas.

Para producir IFNs recombinantes¹⁵⁷ se utilizó la línea HEK293T provista por el área de cultivos celulares del IVIT-CONICET. Esta línea utiliza MEMDc para crecer y debe tripsinarse para realizar los pasajes.

Se utilizó la línea RAW 264.7 de Mφ murinos para poner a punto ensayos de fagocitosis de bacterias que se describirán más adelante. Esta línea utiliza el medio MEMDc y se desprenden de las botellas de cultivo al lavar con buffer fosfato (PBS, del inglés *Phosphate saline Buffer*), de esta forma se realizan los pasajes.

2.3.1.1. Producción de bancos celulares

Para disponer de mayor flexibilidad en los ensayos produjimos bancos de trabajo de las líneas celulares MDBK, HEK293, MDBKT2, SF9, SF9-BIR y SF9-GFP.

Procedimiento realizado para las células MDBK, MDBKT2 y HEK293: a partir de un cultivo de bajo número de pasaje, crecido en botellas de cultivo (Greiner CELLSTAR®) con una confluencia de 70 – 80 %, se elimina el sobrenadante, se lava con PBS y se incuba con tripsina-EDTA 0,25 % (Invitrogen) por 3 minutos a 37 °C. Luego se golpea suavemente la botella con las manos para despegar el cultivo y se detiene la reacción resuspendiéndolas en el volumen adecuado de MEMDc. Las células se cuentan en cámara de Neubauer y se las lleva a una concentración de 10⁶ células/ml en MEMDc. A 1 ml de esta suspensión se le añaden 125 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y 125 µl de SFB (Internegocios) (DMSO al 10 % y SFB al 18 %) y se transfieren a crioviales. Estos se congelan en frascos con isopropanol (Mr Frosty, Thermo Scientific) a -80 °C para almacenarse luego en tanques de N₂ líquido. Para descongelar las células se prepara un frasco T25 (Greiner CELLSTAR®) con MEMDc a 37 °C. El criovial se descongela rápidamente, frotándolo intensamente con las manos, se resuspende y transfiere al T25 preparado, incubándose a 37 °C, 5 % CO₂.

Para congelar células SF9 el contenido de 1 frasco T75 (Greiner CELLSTAR®) creciendo a un 70 – 80 % de confluencia debe centrifugarse y resuspenderse en 2 ml de SFB (Internegocios) añadiéndose DMSO al 10 %. Este contenido puede transferirse a 2 crioviales. Estos se congelan en frascos con isopropanol (Mr Frosty, Thermo Scientific) a -80 °C para almacenarse luego en tanques de N₂ líquido. Para descongelar un criotubo, debe prepararse un T25 con medio TNM-FHc tibio. El tubo se descongela rápidamente en baño con agua a 37 °C, se resuspende y transfiere inmediatamente al T25 preparado. Se lo deja a temperatura ambiente (TA) 15 minutos para permitir la decantación. El medio se reemplaza por volcado y se añade medio TNM-FHc fresco, incubándose a 28 °C.

2.3.2. Cultivos celulares primarios

Los cultivos primarios bovinos provienen de animales libres de BVDV, testeados por RT-PCR anidada y con el kit Priocheck BVDV-PI Plus (Prionics), y para BLV, testeados por un ELISA de uso interno del área de servicios de nuestro Instituto.

2.3.2.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica bovinas

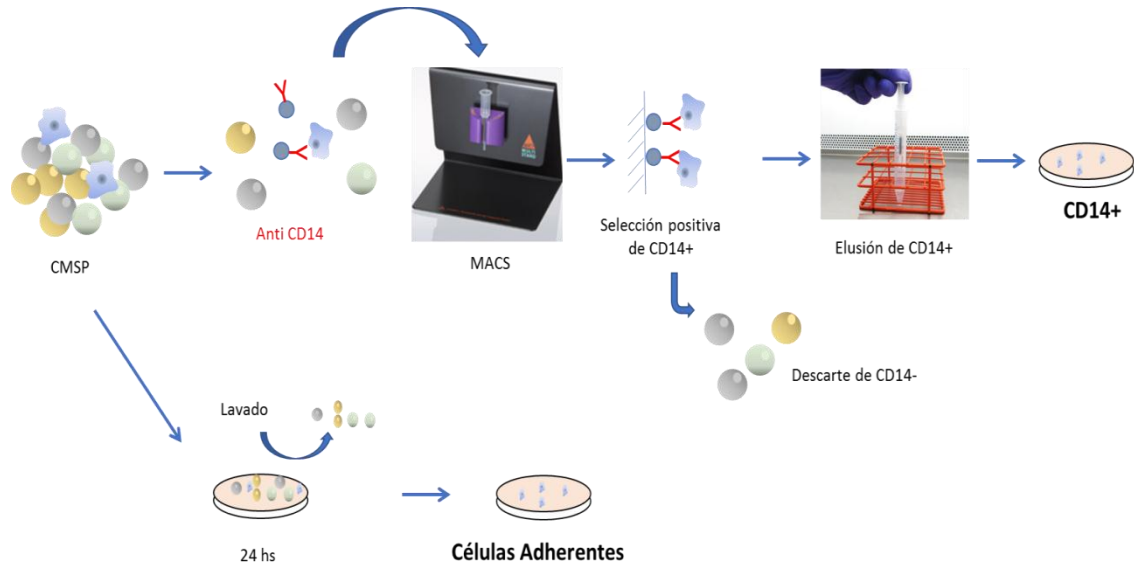
Las CMSP bovinas fueron obtenidas mediante centrifugación por gradiente de densidades. Los animales fueron sangrados utilizando tubos Vacutainer® EDTA (BD, USA) o bien mediante jeringas del volumen requerido dependiente del experimento. En este caso la sangre se trasvasa inmediatamente a tubos conteniendo un 10 % del volumen final en EDTA 0,1M. La muestra se extrae mediante punción de la vena yugular siguiendo los protocolos nacionales de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) (protocolo n° 25/2013 CICUAE - INTA). Las muestras son centrifugadas a 2200 G por 20 minutos a TA. De la suspensión resultante se aspira la capa de leucocitos diluyéndose 1:1 en PBS-EDTA 2 mM. Alícuotas de 4 ml de esta suspensión se depositan en tubos de 15 ml (Greiner® BioOne) conteniendo 3 ml de Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich) y centrifugada a 800 G por 30 minutos a TA. La fase de células mononucleares es recolectada en tubos de 50 ml (Greiner® BioOne) y lavada dos veces con PBS-EDTA 2 mM centrifugándose a 300 G por 10 minutos a TA. El pellet es tratado con buffer de lisis de glóbulos rojos (elaboración propia), lavado con PBS-EDTA 2 mM, centrifugado (300 G, 10 minutos a 4 °C) y resuspendido en medio completo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 suplementado con 10 % SFB, antibiótico-antimicótico (100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina), Glutamina 1x y Hepes 25 mM (RPMIc) (todos reactivos de Gibco). El rendimiento de la purificación se determina haciendo recuento de células en cámara de *Neubauer* evaluando viabilidad celular con el colorante vital *Trypan blue* (Invitrogen).

2.3.2.2. Obtención de macrófagos derivados de monocitos bovinos

Existen dos alternativas principales a la hora de purificar Mo bovinos para la obtención de Mφ derivados de Mo (Mφ-Mo). Ambas técnicas parten de cultivos de CMSP purificados por gradiente de densidades y son ampliamente utilizadas para la obtención de Mφ-Mo bovinos: la

tecnología MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*)^{116,117,125–128} y la adherencia diferencial^{129–131,158–160}. En ambos sistemas, los Mo son cultivados por varios días hasta diferenciarse en M ϕ . (Figura M1).

A



B

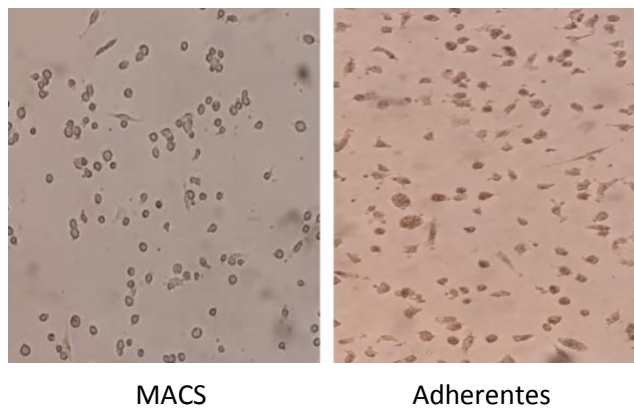


Figura M1. Alternativas para la purificación de Mo. (A) Ambos métodos parten de cultivos de CMSP. La tecnología MACS utiliza un anticuerpo unido a micro partículas magnéticas que es preincubado con las CMSP. Luego el cultivo atraviesa la columna magnética quedando retenidas las células CD14+. A continuación, la columna se separa del magneto y el contenido es eluido, obteniéndose un cultivo enriquecido en células CD14+. Alternativamente las CMSP se cultivan por 24 horas, luego las células no adherentes se remueven por lavado, obteniéndose el cultivo de Mo. (B) Fotografías con el microscopio óptico con 1000 aumentos de cultivos de M ϕ -Mo purificados por la tecnología MACS o por adherencia diferencial en placa de cultivo.

2.3.2.2.1. Purificación de células CD14+ por tecnología MACS

A partir de CMSP bovinas se purifican células CD14+ por selección positiva, utilizando el sistema MACS (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las

CMSP se pre-incuban con un anticuerpo unido a micropartículas magnéticas anti CD14 humano con reacción cruzada frente al CD14 bovino. Posteriormente se hace atravesar la suspensión celular por columnas acopladas a un magneto donde quedan retenidas las células CD14+. A continuación, la columna se desacopla y se eluyen las células CD14+. El rendimiento de la purificación se determina haciendo recuento de células en cámara de *Neubauer* evaluando viabilidad celular con el colorante vital *Trypan blue* (Invitrogen). Las células son lavadas y resuspendidas en RPMIc a razón de 10^6 células/ml y se siembran en el soporte adecuado según el experimento, incubándose a 37 °C, 5 % CO₂, por un mínimo de 96 horas. En esta instancia, los Mφ-Mo son las células que permanecen adheridas cuando se levanta el sobrenadante de cultivo.

2.3.2.2.2. Purificación de células CD14+ por adherencia diferencial en placa de cultivo

Alternativamente se obtienen Mφ-Mo por adherencia a partir de CMSP bovinas. Brevemente, las CMSP purificadas son sembradas en RPMIc en placas multi-pocillo (según el experimento) a razón de 5×10^6 células/ml. A las 24 horas se retira el medio, se lavan con RPMI incompleto (RPMIi) y se restituye medio RPMIc fresco. Los cultivos se incuban por un mínimo de 96 horas a 37 °C, 5 % CO₂. En esta instancia, los Mφ son las células que permanecen adheridas cuando se levanta el sobrenadante de cultivo. Se estima que el rendimiento de Mφ-Mo es aproximadamente el 10 % de las células sembradas.

2.3.2.2.3. Polarización de macrófagos derivados de monocitos bovinos

A partir de cultivos de Mφ el estímulo de polarización se lleva a cabo añadiendo LPS (Sigma-Aldrich) o IFN-γ bovino recombinante (BioRad) para polarizar Mφ hacia un perfil clásico M1 a una concentración de 20 y 10 ng/ml respectivamente, IL-4 bovino recombinante (AbD Serotec-BioRad), o azitromicina (Droguería Saporiti) para inducir un perfil alternativo M2, a una concentración de 20 ng/ml y 30 µg/ml, respectivamente o bien se polarizan Mφ con un perfil antiviral, añadiendo al medio IFN-α bovino recombinante de producción propia¹⁵⁷, para inducir Mφ-Mα a una concentración de 5 UI/ml en medio RPMIc durante 24 horas. Los Mφ sin perfilar "M0" siguen el mismo tratamiento, pero se les reemplaza el medio por RPMIc fresco sin estímulo.

2.3.2.3. Purificación de macrófagos peritoneales murinos

Los animales son anestesiados mediante inhalación de isoflurano (Laboratorio Piramal) y eutanasiados por dislocación cervical. Inmediatamente después de ocurrida la muerte se les inyecta por la vía IP 5 ml de RPMIc. Se masajea intensamente el abdomen y se recupera el medio con las células con la misma aguja y jeringa utilizada en la inoculación. Posteriormente se abre la cavidad peritoneal y se realizan varios lavados con RPMIc recuperando el medio con las células. El exudado es transferido a tubos de 50 ml (Greiner® BioOne) y centrifugado a 300 G, 4 °C se elimina el sobrenadante y se los trata con buffer de lisis de glóbulos rojos (elaboración propia) por 3 minutos. Se lleva cada tubo a 30 ml con PBS, se centrifuga a 300 G, 4 °C y se resuspende el pellet celular en RPMIc. Las células se contabilizan en cámara de *Neubauer* utilizando el colorante vital *Trypan blue* (Invitrogen) y se siembran en placas de 24 pocillos a razón de 10^6 células por pocillo. El número de M ϕ obtenido se estima que es la mitad del sembrado. A las 24 horas el medio es remplazado y se eliminan las células no adherentes.

2.4. Técnicas de virología y diagnóstico

2.4.1. Producción de banco de virus

Las cepas de interés de BVDV son amplificadas en la línea celular epitelial de riñón bovino MDBK. La producción se lleva a cabo en frascos de cultivo celular (Greiner CELLSTAR®). Se inocula el cultivo con la cepa a amplificar, a una multiplicidad de infección (MOI) = 0,1 y se incuba 1 hora a 37 °C en agitación suave. Luego se lava con PBS y se añade el medio MEMD suplementado con SFB (Internegocios) 2 % incubándose por 4 días a 37 °C, 5 % CO₂. Tras este tiempo se congela y descongela 3 veces a -80 °C y se centrifuga a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C para clarificar el medio. El sobrenadante es fraccionado y conservado a -80 °C hasta su utilización, o bien, si se requiere un volumen mayor, puede utilizarse como inóculo para un frasco de cultivo de mayor tamaño. El título de la producción se establece por ensayo de microtitulación descrito más adelante. Paralelamente a la producción viral, se hace crecer un cultivo de MDBK como control, siguiendo el mismo protocolo de amplificación viral, pero sin infectar. Un lisado clarificado de este cultivo celular se utiliza luego en la infección simulada de cultivos primarios bovinos. Para el experimento en ratones se produjo un stock de 98-124 ncp

sin SFB. El proceso es idéntico al descrito, excepto que no se añade SFB al medio de cultivo luego de la infección.

2.4.2. Inactivación de virus

La inactivación viral se lleva a cabo siguiendo un protocolo descrito por nuestro grupo⁸¹. Brevemente, placas de 6 pocillos (ExtraGene) conteniendo 1 ml del medio a inactivar se exponen a luz ultravioleta (UV) a una distancia de 20 cm por 30 minutos. La inactivación viral se verifica mediante el ensayo de microtitulación, considerándose efectiva cuando no se observan pocillos positivos que detecten la presencia de partículas virales.

2.4.3. Infecciones virales

Las infecciones se realizan a la MOI deseada según el experimento, incubando una hora en agitación suave a 37 °C para facilitar la adsorción viral. Luego de este tiempo se elimina el inóculo viral, se lavan las células con RPMIi y se restituye medio de cultivo RPMIc fresco. Las células se incuban a 37 °C, 5 % CO₂ y se cosechan a distintos tiempos, según el experimento. Una infección simulada se realiza siguiendo el mismo protocolo, pero añadiendo un lisado clarificado de células MDBK, en lugar del inóculo viral.

2.4.4. Cinética de replicación viral de un ciclo

10⁵ células sembradas en placas de 96 pocillos (Corning®) se infectan a una MOI de 2. A distintos tiempos post-infección se recupera de cada pocillo el sobrenadante clarificado y el pellet celular. Ambos se almacenan a -80 °C hasta su procesamiento. El mismo proceso se realiza con la infección simulada (Mock) pero se añade un lisado de células MDBK en lugar de virus. Las determinaciones que se realizan a cada una de estas muestras se describen a continuación.

2.4.5. Determinación de la proteína no estructural 3 de BVDV

La replicación viral se determina mediante la producción de NS3 en los pellets celulares utilizando un ELISA comercial (PrioCHECK™ Bovine BVDV PI focus Ag Strip kit, Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por cada muestra se adicionan 50 µl con una concentración de 0,14 µg/µl de proteínas totales. Para estimar la concentración de proteínas se utiliza el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las placas son leídas en un lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific).

2.4.6. Ensayo de microtitulación

La medida de producción viral extracelular con capacidad infectiva se realiza mediante el ensayo de microtitulación descrito^{161,162} con algunas modificaciones. Brevemente, se siembran en placas de 96 pocillos (Corning®) 10 diluciones seriadas en base 4 del virus o la muestra a titular por cuadruplicado. Inmediatamente, se añade una suspensión de células MDBK con 10⁴ células por pocillo en toda la placa en medio DMEM (Gibco) con una concentración final de SFB de 2,5 %. Los pocillos libres de virus funcionan como control de células (CC). Se añaden también controles de virus (CV) con actividad ya conocida. Las placas se incuban durante 5 días a 37 °C, 5 % CO₂.

Para los virus de biotipo cp la placa se revela por observación en microscopio óptico considerando positivo los pocillos donde se visualice efecto citopático (ecp).

Las cepas de biotipo ncp se revelan por inmunofluorescencia directa. Las células se fijan con 3 % de PBS-formaldehído. Cada pocillo es tratado con Glicina 0,1 M en PBS el cual bloquea aldehídos que no reaccionaron tras la fijación evitando fluorescencia inespecífica. Las células se permeabilizan con Tritón X-100 0,2 %. La presencia del BVDV es revelada con un anticuerpo policlonal anti-BVDV (VMRD) conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC, del inglés *fluorescein isothiocyanate*). Las células infectadas son observadas en un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX71). Los pocillos con fluorescencia verde son considerados positivos.

En ambos ensayos, los títulos son calculados como el promedio de las dosis infectivas 50 % en cultivo de tejido por ml (TCID₅₀ ml⁻¹) mediante el método Reed and Muench¹⁶³.

2.4.7. Cuantificación de partículas virales por RT-qPCR

2.4.7.1. Extracción de ARN

Las muestras de ARN se extraen del sobrenadante celular utilizando High Pure Viral RNA Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN es evaluada con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™). Las relaciones de Absorbancia 260/230 y 260/280 son tenidas en cuenta para evaluar la pureza de las muestras, considerándose puras aquellas muestras cuyos valores oscilan entre 1,8 - 2,2 y 1,9 - 2,4 respectivamente.

2.4.7.2. RT-PCR

Para la RT-PCR se utiliza la enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada tubo de reacción contiene 300 ng de ARN, 400 nM del cebador 326-reverse *Pan Pestivirus*¹⁶⁴, 0,4 µl de DMSO puro (Sigma Aldrich) y agua de grado molecular hasta un volumen de 15,5 µl. El extremo 5' genómico de BVDV contiene una estructura terciaria en la región IRES que puede obstaculizar la reacción de retrotranscripción. Por consiguiente los reactivos son calentados a 70 °C por 5 minutos e inmediatamente puestos en hielo con el objetivo de desplegar la estructura de ARN. En otro tubo se añaden 0,2 µg de OligoDT (Biodynamics SRL), 400 µM de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Promega), 1,6 U de inhibidor de ARNasa (Promega), 4 mM de DTT (Invitrogen), y la enzima Transcriptasa Reversa. De esta mezcla se añaden 8,5 µl al tubo anterior, obteniéndose un volumen final de 25 µl. El tubo es calentado a 42 °C por 1 hora y 10 minutos a 94 °C para obtener el ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario en un termociclador T18 (IVEMA).

2.4.7.3. RT-qPCR

La qPCR se lleva a cabo utilizando la mezcla comercial 1X of SSoAdvanced™ Universal SYBR®Green (BioRad), 300 nM de cebadores 326-forward y 324-reverse *Pan Pestivirus*¹⁶⁴ y 5 µl del ADN complementario (ADNc) previamente obtenido, en un volumen final de 25 µl. Para las amplificaciones se utiliza el termociclador en tiempo real iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection

System (BioRad) bajo el siguiente protocolo térmico: 10 min a 95 °C, 45 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Finalmente las muestras son calentadas de 55 °C a 95 °C para producir una curva de *melting* y confirmar la presencia de un único pico de amplificación. Los valores del ciclo umbral (CT, del inglés *Threshold cycle*) son normalizados a una curva estándar derivada de un plásmido que contiene clonada la misma secuencia que se amplifica en las muestras, en una dilución seriada en base 10 de 8 puntos, con una concentración inicial de 10^7 copias/ μ l. Todas las reacciones se corren por duplicado y un control sin muestra se agrega utilizando agua de grado molecular en lugar de muestra. Se utiliza el software iQTM 5 Optical System (BioRad) para calcular la eficiencia de la amplificación y estimar el número de copias de genomas virales.

2.4.8. Diagnóstico de BVDV por RT-PCR anidada

A partir de las muestras a testear, la extracción de ARN y la reacción de RT-PCR son idénticas a las descritas para cuantificación de genomas virales. Para la PCR anidada el ADNc obtenido se utiliza como molde para la primera ronda de la PCR anidada. Cada tubo de reacción contiene dNTPs (Promega) a una concentración de 0,2 mM, 667 nM de cebadores *326-forward* y *324-reverse Pan Pestivirus*¹⁶⁴ y 2 μ l del ADNc previamente obtenido (o agua de grado molecular como control negativo) y la enzima GoTaq® (Promega) según instrucciones del fabricante, en un volumen final de 15 μ l. El perfil de ciclado es 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos a 92 °C por 15 segundos, 56 °C por 20 segundos, 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 5 minutos finales. El producto amplificado esperado es de 288 pb.

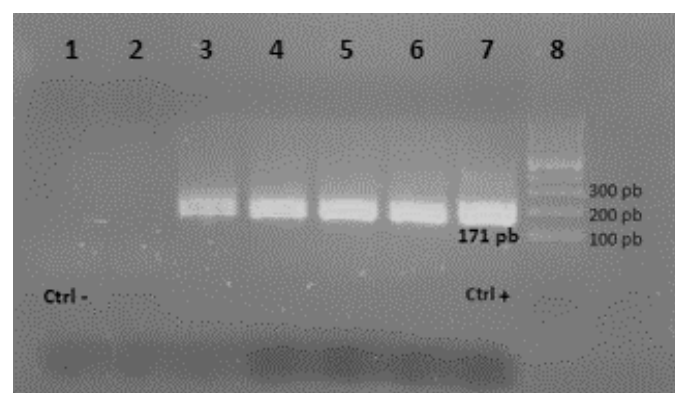


Figura M2. Gel de agarosa transiluminado con UV para diagnóstico de BVDV por PCR anidada. Calles: (1) control -, (2) muestra negativa, (3 a 6) muestras positivas con un amplicón de 171 pb, (7) control +, (8) DNA ladder.

La segunda ronda de PCR requiere 2 μ l de este producto por reacción, 0,2 mM de dNTPs (Promega), 500 μ M de cebadores *Pesti-3* y *Pesti-4*¹⁶⁵ y la enzima GoTaq® en un volumen final de 20 μ l. El perfil térmico es el siguiente: 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos a 92 °C por 15 segundos, 58 °C por 20 segundos, 72 °C por 40 segundos; 72 °C por 5 minutos finales. El termociclador utilizado en ambas rondas es el T18 (IVEMA). El producto de reacción esperado es de 171 pb (**Figura M2**) y es revelado por corrida electroforética en gel de agarosa (1,5 % en buffer Tris acetato EDTA) utilizando el agente intercalante GelRed™ (Biotium), utilizando *DNA ladder* de 1 Kb (Promega).

2.4.9. ELISA en células

El ensayo de ELISA en células para la detección de BVDV fue desarrollado por nuestro grupo y ha sido publicado¹⁵⁷. El ensayo consiste en sembrar las muestras problema sobre un cultivo de células MDBK en crecimiento. Para ello se siembran $2,5 \times 10^4$ células por pocillo y se las deja crecer por 24 horas a 37 °C, 5 % CO₂. Luego las células se lavan y se añaden 60 μ l de diluciones en base 2 de la muestra problema. Se las incuban 1 hora a 37 °C, 5 % CO₂ para permitir la adsorción viral. A continuación, la placa se lava y se le restituye MEMD – SFB 2 %, incubándola por 48-72 horas a 37 °C, 5 % CO₂. Cada tratamiento y controles se siembran por triplicado. Finalizado el tiempo de incubación, las células se fijan con PFA-4 %, y se permeabilizan con Tritón X-100 al 10 %, bloqueándose con suero normal equino al 10 % durante 90 min a TA. El ensayo prosigue como en un ensayo típico de ELISA, donde el antígeno viral se encuentra inmovilizado en las células fijadas. Como anticuerpo de detección se utiliza un anticuerpo monoclonal anti NS3 – (Prionics) 1 hora a 37 °C. Como conjugado se utiliza un anticuerpo anti-ratón (Peroxidase Labeled KPL), 2 horas a TA. El ensayo se revela con ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) diamonio (ABTS) 15 minutos a TA y se detiene con NaF 0,5 M leyéndose la DO a 405 nm. Los resultados se normalizan a la densidad de células por pocillo utilizando el colorante Janus Green 0,2 % (Sigma) 50 μ l por pocillo, 5 minutos a TA. Se realizan 5 lavados suavemente con agua corriente y se añaden 200 μ l/well de HCl 0,5M. Tras 10 minutos a TA se lee la DO a 595 nm utilizando el lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific).

2.5. Ensayos de viabilidad celular y toxicidad de compuestos

2.5.1. Ensayo de metabolización del XTT

La viabilidad celular se estimó utilizando el kit CyQUANT™ XTT (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit incluye el reactivo XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) y el reactivo de acoplamiento de electrones. El reactivo XTT, es un compuesto a base de tetrazolio, que es sensible al potencial redox celular y en presencia de células que respiran activamente se convierte de un compuesto soluble en agua a un producto de formazán de color naranja. El sobrenadante de cultivo se sustituye por el reactivo provisto por el kit en medio RPMI y se incuba por un mínimo de 2 horas a 37 °C, 5 % CO₂. Las placas son leídas en un lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific).

2.5.2. Ensayo de viabilidad por integridad de membranas

En los ensayos de citometría de flujo, la viabilidad fue estudiada utilizando el kit comercial LIVE/DEAD™ (Thermofisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit provee una sonda fluorescente que se une a poliaminas celulares. Cuando la célula pierde la integridad de la membrana, se exponen una mayor cantidad de blancos intracelulares, resultando en una marca mayor. La ventaja frente a otros métodos es que las células pueden fijarse, ganando flexibilidad sobre otros ensayos. Los resultados se visualizan por citometría de flujo. El equipo utilizado es FACScalibur™ y los datos son analizados con el programa CellQuest™ v3.1 (BD Biosciences).

2.5.3. Viabilidad celular por tinción con cristal violeta

El cristal violeta solamente penetra en células que fueron fijadas y permanecen adheridas a la placa de cultivo. Cuando las células mueren, se desprenden de la monocapa dejando un hueco que no es alcanzado por el colorante, de modo que se determina la viabilidad celular al medir la absorbancia retenida en las células, la cual es proporcional al número de células vivas presentes al momento de la fijación. Se utilizaron células MDBK para evaluar toxicidad de compuestos o ecp producido por cepas de biotipo cp de BVDV. Una vez concluido un ensayo con los tratamientos correspondientes, se elimina el sobrenadante de cultivo y se fijan las células con PFA-PBS 4 % por 30 minutos a TA. A continuación se elimina la solución fijadora y se tiñen las células con cristal violeta 0,1 % por 30 minutos a TA. Luego se aspira el colorante

excedente que puede reutilizarse para otros ensayos. Se lava suavemente con agua corriente 3 veces y se deja secar la placa invertida sobre papel absorbente. Cuando la placa está totalmente seca, se escanea a 575 nm con el lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific).

2.6. Expresión de citoquinas

2.6.1. Expresión de citoquinas por RT-qPCR

Las muestras de ARN total se extraen del pellet celular utilizando High Pure RNA Isolation Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN es evaluada con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™). Las relaciones de Absorbancia 260/230 y 260/280 son tenidas en cuenta para evaluar la pureza de las muestras, considerándose puras aquellas muestras cuyos valores oscilan entre 1,8 - 2,2 y 1,9 - 2,4 respectivamente.

Para la obtención de ADNc se utiliza la enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, 300 ng del ARN previamente obtenido 0,2 µg de OligoDT (Biodynamics SRL), 400 µM de dNTPs (Promega), 1,6 U de inhibidor de ARNasa (Promega), 4 mM de DTT (Invitrogen) y agua de grado molecular hasta un volumen final de 25 µl. El tubo es calentado a 42 °C por 1 hora y 10 minutos a 94 °C para obtener el ADNc en un termociclador T18 (IVEMA).

La concentración óptima de cebadores utilizada para la cuantificación de las citoquinas, fue elegida en base a los valores de la eficiencia de amplificación de las curvas estándar ($E\% = 100 \pm 10$) (**Tabla M2**). La qPCR se lleva a cabo usando la mezcla comercial 1X of SSoAdvanced™ Universal SYBR®Green (BioRad), cebadores específicos y 5 µl del ADNc previamente obtenido en un volumen final de 25 µl. Se utiliza el termociclador en tiempo real iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) bajo el siguiente protocolo térmico: 10 min a 95 °C, 45 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Finalmente las muestras son calentadas de 55 °C a 95 °C para producir una curva de *melting* y confirmar la presencia de un único pico de amplificación. Contamos con la secuencia de IFN-γ clonada en un plásmido, lo cual permite su cuantificación de forma absoluta. Todas las reacciones se corren por duplicado utilizando el software iQTM 5 Optical System (Biorad) para calcular la eficiencia de la amplificación y estimar el valor de CT de cada muestra.

Citoquina	Cebador	Secuencia 5' → 3'	Concentración del cebador (nM)	Tipo de cuantificación	Eficiencia de amplificación (E%)
IL-10	Fw Rv	TTCTGCCCTGCGAAAACAA TCTCTTGGAGCTCACTGAAGACTCT	300	Semicuantitativa	90
IL-6	Fw Rv	TGTGAAAGCAGCAAGGAGACA CATCCGTCCTTTCTCCATT	250	Semicuantitativa	99
IFN- λ	Fw Rv	CAGTTCAAGTCTCTGTCCCC ACGAGTCTTCAAAGGCATCC	99	Semicuantitativa	150
IL-12	Fw Rv	CATCAGGGACATCATCAAACCA CCTCCACCTGCCGAGAATT	350	Semicuantitativa	93
IFN- γ	Fw Rv	CTTGAATGGCAGCTCTGAGAAA TGCAGATCATCCACCGGAAT	200	Cuantitativa	106
IFN- α	Fw Rv	GTGAGGAAATACTTCCACAGACTCACT TGARGAAGAGAAGGCTCTCATGA	300	Semicuantitativa	100
TNF- α	Fw Rv	CGGTGGTGGGACTCGTATG GCTGGTTGTCTTCCAGCTTCA	300	Semicuantitativa	102
GAPDH	Fw Rv	GCATCGTGGAGGGACTTATGA GGGCCATCCACAGTCTTCTG	200	Normalizador	99
YWHAZ	Fw Rv	GCATCCCACAGACTATTTCC GCAAAGACAATGACAGACCA	350	Normalizador	110
β -Actina	Fw Rv	GGCCGAGCGGAAATCG GCCATCTCTGCTCGAAGTC	300	Normalizador	102

Tabla M2. Citoquinas utilizadas para expresión determinación por RT-qPCR. Se muestran las secuencias de cebadores utilizados, con la concentración, el tipo de cuantificación (cuantitativa o semicuantitativa) y la eficiencia de amplificación.

2.6.2. ELISAs para la cuantificación de citoquinas

La activación del inflammasoma se determina cuantificando la secreción de IL-1 β , mediante el ELISA comercial Bovine IL-1 β Reagent Kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores de densidad óptica obtenidos de la muestra son extrapolados a una curva estándar construida con diluciones seriadas en base 2 de IL-1 β recombinante bovino con una sensibilidad de entre 4 hasta 2000 pg/ml.

Las determinaciones de TNF- α e IL-10 bovinos se realizaron utilizando kits comerciales de KingFisher Biotech. Los kits proveen los anticuerpos de captura y detección y la proteína recombinante de cada citoquina para utilizar como estándar, siendo el usuario quien determina las concentraciones y el protocolo óptimo de trabajo. Los estándares permiten una cuantificación absoluta de la citoquina en la muestra, siendo el rango de detección de 1,56 a 25 ng/ml y de 0,63 a 10 ng/ml para TNF- α e IL-10 respectivamente. Los ELISAs fueron puestos a punto eligiendo los protocolos del ensayo mostrados en la **Tabla M3**.

Para la determinación de IFN- γ se utilizó el kit comercial ID Screen® Ruminant IFN-g de ID-Vet siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit incorpora un estándar de IFN- γ bovino recombinante, que permite la cuantificación absoluta de IFN en la muestra, en un rango de 9 a 150 pg/ml. Las placas son leídas en todos los casos en el lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific).

	TNF-α	IL-10
Anticuerpo de Captura	1/100, 12 – 18 horas a TA	1/100, 12 – 18 horas a TA
Buffer carbonato, bicarbonato pH = 9,4		
Bloqueo	90 min. a 37 °C	90 minutos a 37 °C
Buffer PBS-SBF 6,7 %		
Muestras y estándar	60 min. a TA	90 minutos TA
Anticuerpo de detección	1/250 60 min. a TA	1/250 60 minutos a TA
HRP-Streptavidin	1/750, 30 min. a TA	1/750, 30 minutos a TA
Revelado	TMB, 10 min. a TA	TMB, 30 min. a TA

Tabla M3: protocolos elegidos para ensayos ELISA de citoquinas TNF- α e IL-10 de KingFisher Biotech.

2.6.3. Determinación de IFN-I e IFN-III bovinos

Los IFNs bovinos recombinantes de producción propia y los IFNs en sobrenadantes de cultivos son determinados incubando estas muestras por 24 horas en la línea reportera celular de riñón bovino MDBKT2 según publicaron Fray y colaboradores¹⁵⁵. Los sobrenadantes provenientes de infecciones virales deben inactivarse primero con luz UV tal como se describió en el punto 2.4.2. Para discriminar entre IFNs de tipo I y III, parte de la muestra debe someterse a tratamiento ácido, provocando un descenso del pH hasta un valor de 2 con HCl 5N, y luego incrementándolo hasta un valor de 7 con NaOH 5N. Los IFN-III son ácido lábiles, de modo que se degradan por el tratamiento ácido. De esta manera, se obtiene una estimación de IFNs totales en la muestra sin el tratamiento ácido y de IFN-I en la muestra correspondiente con el tratamiento ácido. Los IFN-III se estiman como la diferencia entre IFNs totales e IFN-I¹⁶⁶.

La línea celular MDBKT2 se encuentra establemente transfectada con un plásmido que contiene el promotor humano MxA inducible por IFN, en fusión transcripcional al gen que codifica la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Tras 24 horas, las muestras incubadas en la línea MDBKT2 son eliminadas, las células lavadas con PBS, lisadas, clarificadas y conservadas a -80 °C hasta su utilización. Para la cuantificación de la actividad CAT se utilizó el

kit comercial CAT ELISA (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit provee un estándar de CAT que permite una cuantificación absoluta de CAT en la muestra y por consiguiente, estimar de modo indirecto la concentración de IFNs presente en la muestra. Se construye además una curva estándar de IFN recombinante de concentración conocida, para establecer las UI/ml de IFNs presentes en la muestra. El desarrollo de la técnica se esquematiza en la **Figura M3**.

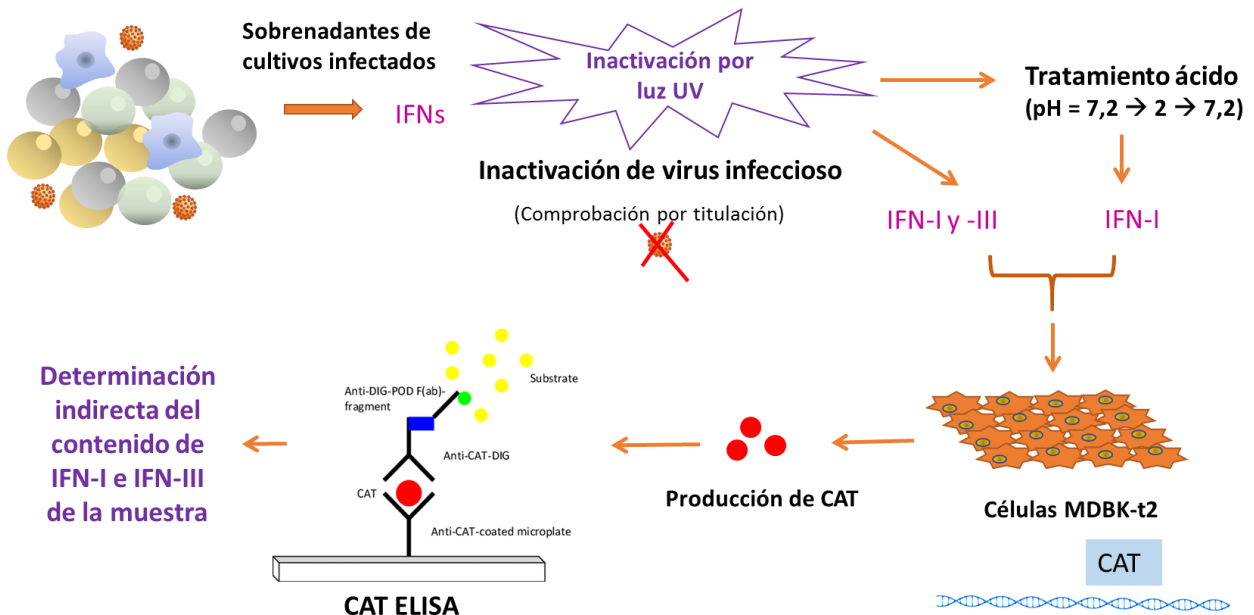


Figura M3. Metodología empleada para la determinación de IFN-I e IFN-III. Los sobrenadantes de cultivos infectados que contienen la muestra incógnita de IFNs son inactivados con luz UV. La muestra se divide en 2 alícuotas: una de ellas prosigue un tratamiento ácido, mientras que la otra permanece inalterada. Ambas muestras son utilizadas para estimular células MDBKT2 que producen CAT al ser estimuladas por IFNs. La producción de CAT se estima por ELISA comercial, determinando de manera indirecta el contenido de IFNs en la muestra original. El sistema permite la discriminación entre IFN-III (ácido lábiles) e IFN-I.

2.7. Ensayos de citometría de flujo

2.7.1. Tropismo del BVDV en células mononucleares de sangre periférica

Los cultivos purificados de CMSP bovinos son infectados con el BVDV a una MOI = 0,2 y 2, o bien se les practica infección simulada, y son sembradas en placas de 6 pocillos con un mínimo de 2×10^6 células/pocillo (Greiner CELLSTAR) e incubadas a 37 °C, 5 % CO₂. A las 24 hpi las células son levantadas de la placa utilizando PBS-EDTA 2 mM, lavadas con PBS y llevadas a una

concentración de 10^6 células/ml. Las CMSP son marcadas con un compuesto fluorescente comercial (LIVE/DEAD™ ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante, permitiendo discriminar entre células vivas de aquellas que han perdido la integridad de su membrana. Seguidamente las muestras son lavadas, resuspendidas en PBS-SFB 2 % y sembradas en placas fondo “V” de 96 pocillos (Greiner CELLSTAR®) para ser marcadas con los anticuerpos que reconocen marcadores de superficie. Las células se incuban por 30 minutos a 4 °C en oscuridad con los anticuerpos, CD21 conjugado con R-ficoeritrina (RPE, del inglés *R-phycoerythrin*), CD4-RPE, CD8-RPE y CD172a-RPE-Alexa 647 (Todos de AbD SEROTEC), luego se lavan con PBS-SFB 2 % y se fijan con PBS-PFA-1 % durante 20 minutos a 4 °C. A continuación las CMSP son permeabilizadas con PBS-SFB 2 % saponina 0,5 % durante 10 minutos. Paralelamente se preincuba el anticuerpo policlonal frente al BVDV-FITC (VMRD) en un lisado clarificado de CMSP en PBS-SFB 2 %, para secuestrar posibles epitopes intracelulares que provoquen unión inespecífica del anticuerpo. Esta solución se añade a las células, incubándose durante 1 hora a TA en oscuridad (**Figura M4**). A continuación se lavan las muestras con PBS-SFB 2 % 0,5 % saponina y se resuspenden en PBS-PFA 0,2 % almacenándose a 4 °C en oscuridad hasta su lectura. El citómetro de flujo utilizado es FACScalibur™ y los datos son analizados con el programa CellQuest™ v3.1 (BD Biosciences).

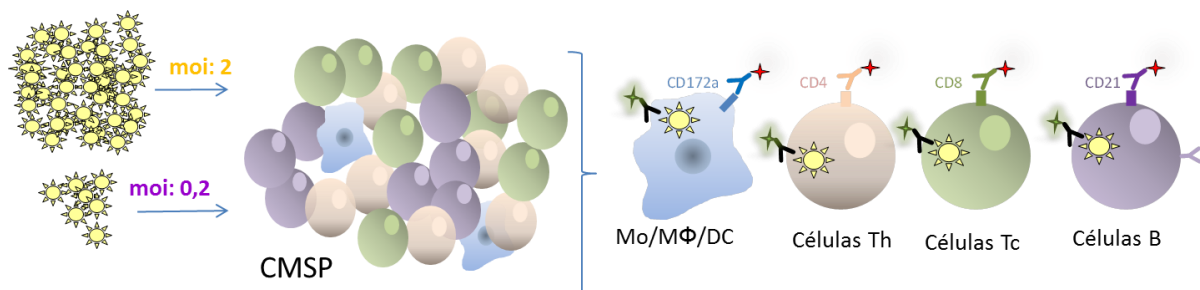


Figura M4. Representación esquemática de la doble marcación en CMSP. Los cultivos purificados de CMSP fueron infectados a una MOI = 2, 0,2, o bien se les practicó infección simulada. Se marcaron en superficie con anti CD4PE (TCD4), anti CD8PE (TCD8), antiCD21PE (B) y anti CD172a (MΦ, Mo y CD). Luego se permeabilizaron y se les realizó una marcación intracelular con anti BVDV-FITC.

2.7.2. Caracterización de marcadores de superficie en macrófagos perfilados

Los ensayos parten de cultivos de MΦ-Mo bovinos sembrados en placas de 6 pocillos (Greiner CELLSTAR) con un mínimo de 2×10^6 células/pocillo. Las células son levantadas de la placa utilizando PBS-EDTA 2mM, lavadas con PBS y llevadas a una concentración de 10^6 células/ml. Los MΦ son marcados con el compuesto fluorescente comercial (LIVE/DEAD™ ThermoFisher)

siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente las muestras son lavadas, resuspendidas en PBS-SFB 2 % y sembradas en placas fondo "V" de 96 pocillos (Greiner CELLSTAR) para ser marcadas con los anticuerpos que reconocen marcadores de superficie. Las células se incuban por 30 minutos a 4 °C en oscuridad con anticuerpos anti- CD172a-RPE-Alexa 647, CD205-FITC, CD16-FITC, CD40-FITC, CD86-FITC, MHC-II-RPE, MHC-I-RPE y CD14-FITC (Todos de AbD SEROTEC). Luego se lavan con PBS-SFB 2 % y se fijan con PBS-PFA-0,2 %, almacenándose a 4 °C en oscuridad hasta su lectura. El citómetro de flujo utilizado es FACScalibur™ y los datos son analizados con el programa CellQuest™ v3.1 (BD Biosciences). Se estudiaron marcadores de superficie a las 24 horas post estímulo de perfilación de Mφ-Mo, o bien, se infectaron los Mφ-Mo perfilados con una MOI = 2 (o se les practicaba infección simulada) para hacer la caracterización a las 72 hpi.

2.8. Producción de E2 recombinante

La proteína E2 de BVDV fue producida en el sistema baculovirus y propagada en la línea celular SF9. Brevemente, contamos con un baculovirus recombinante donde se reemplazó el gen de la poliedrina por la secuencia de E2 de BVDV sin la región transmembrana y flanqueada en el extremo 5' por la secuencia del péptido señal de la proteína gp64 de baculovirus que será traducida en una proteína que sigue la vía secretoria en células de insecto, y por el péptido aceptor de biotina BAP (del inglés, *Biotin Acceptor Peptide*). Asimismo contamos con la línea celular de insectos SF9-BIR. Esta línea se encuentra transfectada establemente con un plásmido que codifica la proteína Biotin-ligasa BirA de *E. coli*, de modo que la infección de estas células con el baculovirus recombinante en presencia de biotina provoca la secreción de E2r biotinilada al medio de cultivo¹⁶⁷. El baculovirus recombinante y la línea SF9-BIR nos fueron cedidos por el Dr. Diego Álvarez de la UNSAM.

En primera instancia procedimos a la amplificación del baculovirus recombinante sobre células SF9. Esta producción viral fue titulada en células SF9-GFP que emite fluorescencia verde tras infectarse con baculovirus. La línea SF9 y SF9-GFP fueron cedidas por el Dr Oscar Taboga del Instituto de Biotecnología, CICVyA – INTA. El stock producido de baculovirus se utilizó para infectar células SF9-BIR en presencia de biotina y se cosechó el sobrenadante con la proteína E2r. La proteína se evaluó por Western Blot (WB) y la actividad biológica por inhibición de ecp en células MDBK. Paralelamente a la producción de la proteína se repitió el proceso sin infectar con el baculovirus recombinante, de modo de obtener un sobrenadante que pudiera

utilizarse como control negativo de la producción. Las técnicas empleadas se describen a continuación.

2.8.1. Amplificación de baculovirus recombinante

Se siembran células SF9 en medio TNM-FH (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % SFB (TNM-FHc) en botellas de cultivo celular (Greiner CELLSTAR®) a una confluencia de 70 - 80 %. Se espera a que las células decanten incubando en estufa a 28 °C por 30 minutos. A continuación, se retira el medio y se almacena a TA para utilizarlo posteriormente. Las células son infectadas añadiendo el inóculo viral a una MOI = 0,1 en TNM-FH incompleto (TNM-FHi). Se incuba por 1 hora a 28 °C para facilitar la adsorción viral. Luego se retira el inóculo y se restituye el medio previamente guardado. Se incuba por 5 días a 28 °C monitoreando el ecp. Tras este tiempo, se recupera el sobrenadante, se centrifuga para clarificarlo y se almacena a 4 °C hasta su utilización.

2.8.2. Titulación del baculovirus recombinante

Se preparan tubos conteniendo 130 µl de diluciones seriadas en base 10 del baculovirus a titular, en un rango de 10^{-2} a 10^{-8} en medio TNM-FHc suplementado con blasticidina 10 µg/ml. Un tubo adicional va a contener solamente 130 µl de medio de cultivo para el CC. Paralelamente se prepara una suspensión de células SF9-GFP a razón de 10^5 células/ml en medio TNM-FHc. Se añaden 1170 µl de cada suspensión a los tubos conteniendo las diluciones de baculovirus. Se siembran 100 µl por pocillo de la suspensión en placa de 96 pocillos y los CC con 12 réplicas cada uno. De esta manera quedan diluciones del baculovirus en un rango de 10^{-3} a 10^{-9} con 9000 células por pocillo. La placa se incuba por 7 días a 28 °C, tras lo cual, las células son observadas en un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX71). Cada pocillo con al menos una célula con fluorescencia verde se considera positivo. El título se calcula con el método Reed y Muench¹⁶³ y se expresa como TCID₅₀ ml⁻¹.

2.8.3. Infección de células SF9-BIR y producción de la proteína

La infección es muy similar a la descrita en 2.8.1. La diferencia es que la línea celular que se infecta es la SF9-BIR en presencia de biotina 100 μM , la infección se realiza a una MOI = 2,5 y el medio TNM-FHc se suplementa con blasticidina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El medio es cosechado a las 72 hpi y clarificado, conteniendo la proteína E2r soluble.

2.8.4. Detección de E2 recombinante por Western Blot

Las muestras conteniendo E2r se hirvieron por 5 minutos en buffer reductor SDS β -Mercaptoetanol y se corrió en un gel de poliacrilamida 10 % para resolver la muestra mediante SDS-PAGE a un voltaje constante de 120 V durante 90 minutos. A continuación, se realizó una transferencia semi-seca de las proteínas presentes en el gel a una membrana de nitrocelulosa (HybondTM-P, GE Healthcare[®]) pre-activada en metanol por 15 segundos, utilizando el dispositivo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) por 20 minutos a 20 V. La transferencia se corroboró con una tinción con rojo Ponceau. Luego la membrana se bloqueó en PBS-Leche 5 % durante toda la noche (ON, del inglés *overnight*) a 4 °C. La membrana se dividió en 2 secciones según el anticuerpo con el cual se deseaba revelar. De esta manera uno de los fragmentos de la membrana se incubó con un HRP streptavidina peroxidasa (KPL) para revelar biotina y el otro con un suero de cobayo anti E2 (producido en nuestro laboratorio)¹⁶⁸ durante 1 hora a 37 °C con agitación. Para el segundo fragmento de membrana se utilizó el anticuerpo anti cobayo peroxidasa (KPL) incubando 1 hora a 37 °C con agitación. Por último, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se reveló con ECL Western Lightning Plus (Perkin Elmer[®]). Se incluyeron los siguientes controles para cada fragmento de membrana: como control negativo de la producción, se utilizó sobrenadante de SF9 con biotina añadida (sin producción de E2r), como control positivo del ensayo anti biotina, se utilizó un anticuerpo biotinilado de rata anti ratón IgG1, y como control positivo del ensayo anti-E2 se utilizó una producción de E2r de una tesis anterior (Dra. Olga Franco-Mahecha).

La proteína E2r fue detectada por WB pero lamentablemente no mostró señales de estar biotinilada.

2.8.5. Cuantificación de E2 recombinante por *in house* ELISA

El ELISA para cuantificación de E2r fue desarrollado por nuestro grupo¹⁶⁸. Se utiliza el anticuerpo anti-E2 monoclonal H29, gentilmente cedido por la Dra. Seki del CEVAN en una

dilución 1/250 para recubrir la placa en buffer de captura ON. A continuación, la placa se lava y se bloquea por 30 minutos a 37 °C. Luego se adicionan las muestras y una E2r de referencia purificada, previamente cuantificada por SDS-PAGE contra un estándar de albúmina. Para la detección se utiliza un suero de cobayo anti-E2 producido en nuestro laboratorio¹⁶⁸ (1 hora, 37 °C) y como anticuerpo conjugado se utiliza un anti-cobayo peroxidasa (1 hora, 37 °C) (KPL), ambos a una concentración de 1/1500. El revelado se realiza con ABTS, incubando por 20 minutos a TA y se detiene adicionando NaF 0,5 M. La lectura se realiza a una DO de 405 nm utilizando el lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific).

2.8.6. Actividad biológica de E2 recombinante por inhibición de efecto citopático

Se siembra una suspensión de células MDBK con una concentración de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placa de 96 pocillos y se incuba por 24 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Posteriormente las células se lavan con MEMD incompleto (MEMDi) y se añaden diluciones seriadas en base 2 de la proteína E2r, en un rango de 0,5 a 256ng/ml, incubándose por 30 minutos a TA. A continuación, se añade el inóculo viral BVDV Singer cp a una MOI = 0,01. Se incluyen controles de células infectadas sin E2r añadida (CV) y controles de células sin infectar y sin E2r añadida (CC). La metodología se esquematiza en la **Figura M5**.

Controles adicionales	Función
Sobrenadante SF9-biotina (sin E2r)	Verificar que no se produzca inhibición de ecp infectado con el BVDV.
Sobrenadante SF9-biotina (sin E2r)	Verificar que no se produzca ecp por toxicidad del medio de cultivo de células de insectos.
E2r máximas concentraciones sin infectar.	Verificar que no se produzca ecp por toxicidad de E2r.

Tabla M4. Controles adicionales añadidos al ensayo de inhibición del ecp de E2r.

Para verificar posibles efectos de toxicidad y/o especificidad del efecto de E2r y del sobrenadante de células SF9 sobre el cultivo de células MDBK, se incluyen los controles que se detallan en la **Tabla M4**. La placa se incuba por 96 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. El ensayo se revela por tinción con cristal violeta. El porcentaje de inhibición del ecp se calcula como:

$$\text{Inhibición de ecp (\%)} = 100 \times \frac{\text{Muestra}_{DO\ 575\ \text{nm}} - \text{CV}_{DO\ \text{media}\ 575\ \text{nm}}}{\text{CC}_{DO\ \text{media}\ 575\ \text{nm}} - \text{CV}_{DO\ \text{media}\ 575\ \text{nm}}}$$

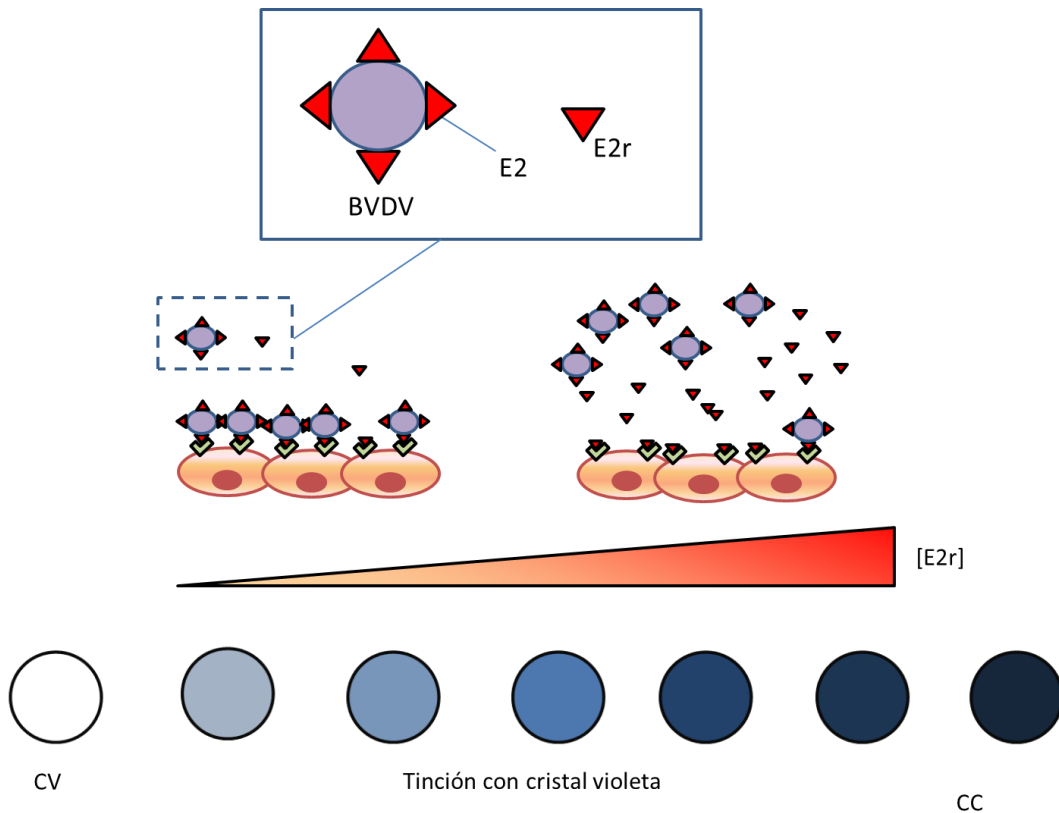


Figura M5. Representación esquemática del ensayo de inhibición de ecp por E2r. Las células MDBK son pretratadas con concentraciones crecientes de E2r inhibiendo la infección por el BVDV. El ensayo se revela por tinción con cristal violeta. CV: control de virus (BVDV sin E2r), CC: control de células (sin BVDV ni E2r).

2.9. Entrada del BVDV en macrófagos

El cultivo de Mφ-Mo fue sembrado en placa de 96 pocillos (Greiner CELLSTAR®) con una concentración de 10^5 células/pocillo. Antes de la infección *ex vivo*, las células fueron pretratadas con diluciones seriadas de E2r de distintas concentraciones según el experimento, DC-SIGN (Sigma) diluciones 1/10 a 1/640 y Mannan 1 a 20 mg/ml (ambos de Sigma Aldrich), mientras que el inóculo viral fue pre-tratado con un anticuerpo monoclonal anti-E2¹⁶⁸. Se añadieron controles de toxicidad con las concentraciones más altas de DC-SIGN, E2r y sobrenadante de la línea celular SF9 para verificar que los tratamientos no afectaran la viabilidad celular y de modo indirecto la replicación viral.

La replicación viral se evaluó por presencia de la proteína viral NS3 por ELISA y la viabilidad celular se estimó utilizando el kit XTT previamente descrito.

2.10. Producción de IFN-I e IFN-III recombinantes

Nuestro grupo produjo IFN-I e IFN-III bovinos recombinantes con actividad biológica antiviral¹⁵⁷. Brevemente, se realizan transfecciones con plásmidos conteniendo las secuencias de los IFNs en células HEK293T. Las células HEK293T son sembradas en una placa de 10 mm a una concentración de $2,4 \times 10^6$ células/ml. Se añaden 8 µg del ADN a transfectar en un tubo de 2 ml con 300 µl de MEMDi sin antibióticos. Se agita suavemente para luego añadir 80 µl del reactivo Polyfect (Qiagen®). Se resuspende y se incuba durante 5-10 min a TA. A continuación, se añade 1 ml de medio MEMDc adicionando todo el contenido a la monocapa celular. A las 48 horas se cosecha el sobrenadante, se clarifica, alicuota y almacena a -80 °C hasta su utilización. La cuantificación de los IFNs recombinantes se realiza en el sistema MDBKT2 – CAT ELISA descrito.

2.11. Actividad fagocítica en macrófagos derivados de monocitos perfilados

El ensayo es similar al descrito por Rodríguez-Padilla y col.¹²⁹ con algunas modificaciones. Una suspensión bacteriana de *E. coli* cepa TOP10 se deja crecer ON en medio Luria Broth (LB) a 37 °C y 200 rpm de agitación. De este cultivo se realiza una dilución 1 en 400 en RPMIc sin antibióticos (RPMIcs/atb) para producir el inóculo bacteriano. A cultivos de Mφ-Mo bovinos sembrados en placas de 96 pocillos a razón de 2×10^5 células por pocillo y perfilados con LPS, IL-4 e IFN-α se les retira el sobrenadante y son expuestos al inóculo bacteriano. La placa se centrifuga a 600 G, 10 minutos para bajar las bacterias y luego se incuba 2 horas a 37 °C para permitir que tenga lugar la fagocitosis. A continuación, se retira el inóculo y se incuba con gentamicina (Gibco) a una concentración de 100 µg/ml en RPMIcs/atb, 1 hora a 37 °C, para eliminar las bacterias extracelulares que no han sido fagocitadas. Tras este tratamiento las células se lavan 2 veces con RPMIcs/atb y se lisan con Tween 20 0,5 % para liberar las bacterias fagocitadas. De estas muestras se realizan diluciones seriadas en base 10 en medio LB y se siembra la dilución adecuada en placa de LB-agar para establecer las unidades formadoras de

colonias (UFC) por ml. Del mismo modo se determinan las UFC/ml del inóculo bacteriano. El índice de fagocitosis se establece como UFC (ml^{-1}) / número de M ϕ por pocillo. El flujo de trabajo se esquematiza en la **Figura M6**.

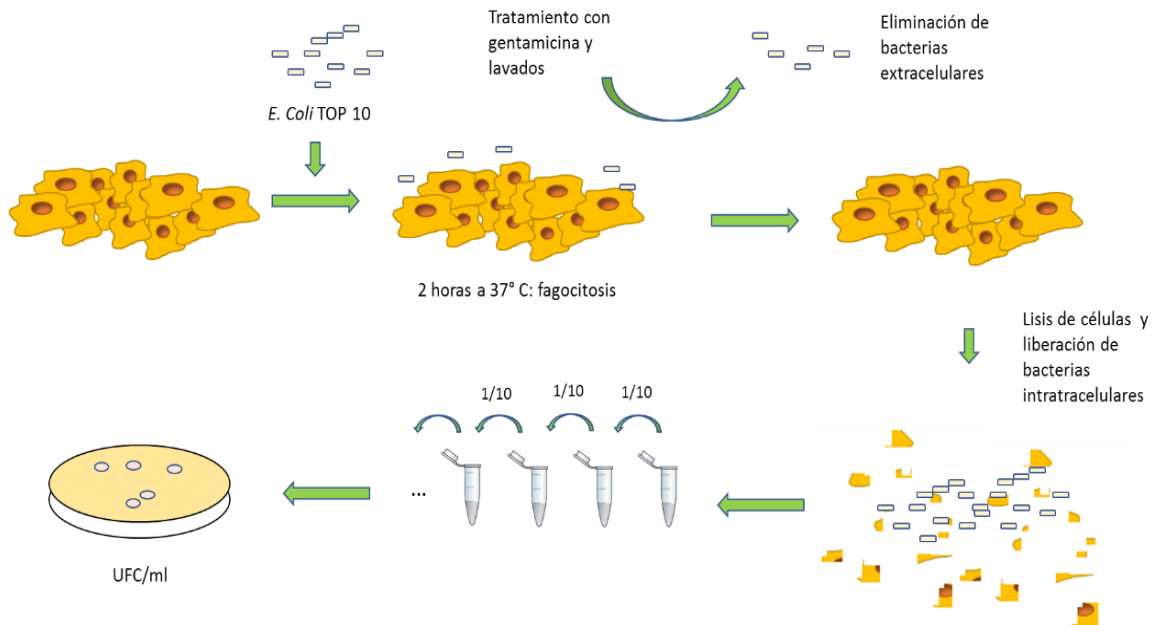


Figura M6. Representación esquemática de ensayos de actividad fagocítica en M ϕ -Mo perfilados con LPS, IL-4 o IFN- α . Los cultivos de M ϕ -Mo son expuestos a una suspensión bacteriana de *E. coli* TOP10. Se incuban 2 horas a 37 °C para permitir la fagocitosis. Luego se retira el inóculo y se tratan los cultivos con gentamicina por una hora adicional a 37 °C para eliminar las bacterias extracelulares no fagocitadas. A continuación se lisan las células liberando las bacterias fagocitadas. A estas muestras se les realiza diluciones seriadas en base 10 para determinar las UFC/ml. El índice de fagocitosis se establece como UFC (ml^{-1}) / número de M ϕ por pocillo.

Se determinaron además las UFC/ml de 2 controles adicionales. Un pocillo adicional sin células fue sembrado con el inóculo bacteriano y recibió el mismo tratamiento que los cultivos celulares. Dado que los cultivos de M ϕ -Mo no forman una monocapa, quedan espacios de la placa no ocupados por células donde podrían quedar adheridas al plástico bacterias no fagocitadas. Además, se estimaron las UFC/ml del sobrenadante del último lavado previo a lisar los M ϕ -Mo, para estimar la contribución de bacterias extracelulares sobrevivientes al antibiótico. Las contribuciones de bacterias de estos 2 controles resultaron despreciables.

Previo a estos ensayos fue necesario establecer la concentración de gentamicina más alta que no resultara tóxica en los M ϕ -Mo. Para ello se expuso a los cultivos de M ϕ -Mo a concentraciones de gentamicina en un rango de 25 a 600 $\mu\text{g/ml}$ incubando 1 hora a 37 °C y estimando luego la viabilidad con el kit XTT. Se dejaron pocillos sin tratamiento de antibiótico al cual se le asignó un valor de 100 % de viabilidad.

Este ensayo se realizó también con M ϕ -Mo perfilados e infectados con el BVDV a una MOI = 2, o bien con infección simulada para el control, determinándose el índice de fagocitosis a las 24 hpi.

2.12. Actividad arginasa

La actividad arginasa se determina utilizando el kit comercial Arginase Activity Assay Kit (Sigma Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. La arginasa es la enzima que cataliza el último paso del ciclo de la urea, convirtiendo la arginina en urea y ornitina. La urea producida durante la reacción con los reactivos del kit, va acompañada del desarrollo de color. Una unidad de arginasa es la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de L-arginina en urea y ornitina por minuto a un pH de 9,5 a 37 °C. El kit provee un estándar de urea con un límite de detección de 0,3 U/l en 2 horas de ensayo a 37 °C.

Cuando se determinan muestras provenientes de suero se depleta la urea sérica añadiendo un paso de ultrafiltración utilizando un filtro con un punto de corte de 10 kDa de peso molecular (Vivaspin Sartorius).

En el ensayo donde se comparó actividad arginasa de M ϕ -Mo purificados por MACS o adherencia, se normalizó la actividad arginasa a la cantidad de proteínas en la muestra expresada en gramos. La determinación de proteínas se realizó utilizando el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las placas son leídas en un lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific).

2.13. Determinación de óxido nítrico

Para la determinación de NO se utiliza el kit comercial QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay Kit de BioAssay Systems, siguiendo las instrucciones del fabricante. El NO es altamente inestable y se oxida en contacto con oxígeno, dando lugar a nitritos y nitratos. El ensayo incorpora un paso de reducción de nitratos a nitritos para después realizar una reacción de Griess optimizada. Se trata de un ensayo colorimétrico con un rango de detección de entre 0,6 a 100 μ M.

2.14. Ensayos de actividad biológica de la azitromicina

La azitromicina es un antibiótico macrólido de amplio espectro capaz de modular M ϕ -Mo hacia un perfil M2, tanto *in vitro* como *in vivo*^{169–174}. La droga base comercial (Droguería Saporiti) es altamente insoluble en agua. Para lograr disolverla en fase acuosa es necesario preparar una solución que contiene dihidro azitromicina (209,6 mg), ácido cítrico (153,8 mg), hidróxido de sodio (79,3 mg) y H₂O MilliQ (1920 μ l).

La solución resultante tiene un volumen de 2 ml con una concentración equivalente a 100 mg/ml de azitromicina. Luego se filtra en esterilidad con un filtro con diámetro de poro de 0,2 μ m. La solución fue preparada al momento de utilizarse en todos los experimentos.

2.14.1. Actividad antibacteriana de azitromicina

Se prepararon 5 tubos cónicos estériles (Greiner® BioOne) conteniendo 2 ml de LB con diluciones seriadas en base 5 de azitromicina en un rango de 8 a 5000 μ M. Se añadió a cada tubo 100 μ l de un cultivo bacteriano de *E. coli* cepa TOP10 que había crecido ON a 37 °C y 200 rpm de agitación. A un tubo adicional con 2 ml de LB sin antibióticos se le añadieron 100 μ l de un cultivo bacteriano (C⁺) mientras que otro tubo conteniendo solamente LB sirvió como control negativo (C⁻). Los tubos se dejaron crecer ON a 37 °C y 200 rpm de agitación. Al día siguiente el contenido de los tubos fue sembrado en placa de 96 pocillos por cuadruplicado y se leyó la densidad óptica a 600 nm en el lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Scientific). La inhibición del crecimiento bacteriano porcentual se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición crecimiento bacteriano (\%)} = 100 \times \frac{\text{Muestra}_{DO\ 600\ \text{nm}} - C_{DO\ \text{media}\ 600\ \text{nm}}^+}{C_{DO\ \text{media}\ 600\ \text{nm}}^- - C_{DO\ \text{media}\ 600\ \text{nm}}^+}$$

2.14.2. Actividad antiviral y toxicidad de azitromicina

Para establecer la actividad antiviral de la azitromicina se sembraron 2×10^4 células MDBK por pocillo en una placa de 96 pocillos, en medio MEMDc con 8 réplicas de diluciones seriadas en base 2 de azitromicina, en un rango de concentraciones desde 12,5 hasta 6400 μ M y se las incubó por 24 horas a 37 °C, 5 % CO₂. Luego el sobrenadante fue retirado, lavado con MEMDi, y se infectó con BVDV Singer cp con una MOI = 0,5 en MEMD – SFB 2 %. El inóculo fue

preparado sobre el mismo rango de diluciones de azitromicina, de modo que los cultivos estuvieron expuestos a las mismas concentraciones de azitromicina durante la duración del ensayo. A la mitad de las réplicas se les añadió MEMD – SFB 2 % con el mismo rango de diluciones de azitromicina, pero sin inóculo viral (Mock). Se incluyeron los correspondientes CC sin infectar y sin antibióticos, y los CV (controles de células infectadas sin antibióticos). La placa se incubó a 37 °C, 5 % CO₂ por 72 horas adicionales y se reveló por tinción con cristal violeta. Sobre el tratamiento Mock se estableció la toxicidad de azitromicina en el rango de concentraciones ensayado. La actividad antiviral porcentual se determinó como sigue:

$$\text{Actividad antiviral (\%)} = 100 \times \frac{Muestra_{DO\ 575\ nm} - CV_{DO\ media\ 575\ nm}}{CC_{DO\ media\ 575\ nm} - CV_{DO\ media\ 575\ nm}}$$

La viabilidad porcentual se calculó con la siguiente ecuación, asignándole un valor de 100 % a la DO media del CC:

$$\text{Viabilidad (\%)} = 100 \times \frac{Muestra_{DO\ 575\ nm}}{CC_{media\ DO\ 575\ nm}}$$

2.15. Ensayo de infectividad de múltiples cepas

Se purificaron Mo proveniente de 4 animales por adherencia diferencial en placa, y se sembraron en placas de 24 pocillos, para determinación de actividad arginasa, o en placas de 96 pocillos para el resto de las determinaciones. Transcurridos 7 días se perfilaron con los estímulos LPS, IL-4, IFN- γ , azitromicina o se los dejó sin perfilar tal como se detalló en 2.3.2.2.3. De las placas de 24 pocillos se determinó actividad arginasa a las 24 horas post estímulo. A continuación los cultivos se infectaron con cepas de genotipo 1 y 2 y biotipo cp y ncp a una MOI = 2 (**Tabla M1**). A las 24 hpi, de un set de réplicas se retiró el sobrenadante y se determinó viabilidad celular con el kit XTT. Del resto de los cultivos se cosecharon sobrenadantes, se clarificaron y almacenaron a -80 °C para determinar posteriormente la producción de virus infeccioso por ensayo de microtitulación. Los pellets celulares fueron lavados y almacenados a -80 °C para determinar luego replicación viral mediante ELISA NS3.

2.16. Actividad arginasa y producción de IFNs en macrófagos derivados de monocitos provenientes de animales de distinto status fisiológico

Se tomaron muestras de sangre proveniente de vacas adultas (n=4), vacas cursando el primer trimestre de preñez (n = 4) y terneros menores de 2 meses de edad (n = 3) y se purificaron CMSP para obtener, luego de 9 días de cultivo Mφ-Mo. Las células fueron cosechadas, lavadas y se determinó la actividad arginasa y la producción de IFNs.

2.17. Experimentos *in vivo*

2.17.1. Modelo murino

30 ratones machos BALB/c de entre 28 – 33 días y entre 20 – 22 gramos fueron alojados en 6 jaulas con 5 animales cada una. Se armaron 3 grupos experimentales que fueron marcados diferencialmente con ácido pícrico 1 % en el lomo en la zona del cuello, en la cadera, o bien se dejaron sin marca, siendo distribuidos de manera homogénea en las distintas jaulas.

18 animales recibieron un tratamiento de azitromicina 150 mg/Kg en 200 µl de PBS por la vía intraperitoneal (IP) y a los 12 animales restantes se les aplicó 200 µl de PBS IP conformando el grupo control. Dentro del grupo que recibió el tratamiento de azitromicina, un subgrupo recibió un día después la aplicación de 200 µl de un inhibidor específico de arginasa, el clorhidrato de 6-borono-L-norleucina, clorhidrato de ácido 2(S)-amino-6-borono-hexanoico (ABH) (Sigma Aldrich) 10 mg/Kg, en PBS también por la vía IP. Los tratamientos y las dosis fueron tomadas de Amantea y col.¹⁷⁰. En ese mismo momento se separaron 3 animales del grupo azitromicina y 3 del grupo control para su procesamiento. Estos animales conformaron el tiempo 0. Una hora después se infectó a todos los animales restantes con 400 µl de MEMDi conteniendo $1,25 \times 10^6$ TCID50/ml de BVDV 98-124 ncp sin SFB por la vía IP. La infección en el modelo murino fue publicada por nuestro grupo¹⁷⁵ y cuenta con protocolo de bienestar animal aprobado (protocolo n° 6/2017 CICUAE - INTA).

Los días siguientes se sacrificaron animales a tiempos 1, 2, 4 y 7 dpi. Los tratamientos, el número de animales sacrificados cada día, así como su grupo experimental se detallan en la **Tabla M5**. Cada animal fue anestesiado con isoflurano y sangrado a blanco por el globo ocular.

La sangre entera se dejó reposar 30 minutos a TA, luego fue centrifugada a 1500 G y se separó el suero almacenándose a -80 °C para posterior determinación de viremia por ELISA en células¹⁵⁷. Inmediatamente los animales se sacrificaron por dislocación cervical. De estos se purificaron Mφ peritoneales y se sembraron en placas de 24 pocillos (ExtraGene), a razón de 5×10^5 células por pocillo. Estas muestras se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ por 24 horas. A continuación se lavaron y cosecharon, almacenándose a -80 °C para posterior determinación de NS3 y arginasa.

DPI	Azitromicina (Az. 150 mg/kg en 200 µl de PBS vía IP)	Control (200 µl de PBS vía IP)
-1	18	12
0	ABH (ABH, 10 mg/Kg en 200 µl de PBS vía IP)	
	4	
Sacrificio		
0	3 (Az.)	3
Infección BVDV 400 µl de 98-124 ncp $1,25 \times 10^6$ TCID ₅₀ /ml en MEMDi vía IP		
1	3 (Az.)	3
2	3 (Az.)	2
4	2 + 2 (Az. + ABH)	2
7	3 + 2 (Az. + ABH)	2

Tabla M5. Diseño experimental y cronología del experimento realizado en ratones.

2.17.2. Modelo bovino

Se realizó un experimento en terneros menores de 2 meses de edad, sanos, libres de BVDV y BLV, alojados en el Campo Experimental del CNIA - INTA. Se armaron 3 grupos experimentales compuesto de 3 animales cada uno (n total = 9). El peso de los animales osciló entre 78 y 96 Kg al momento de inicio del experimento, con excepción de un animal de 65 kg que fue asignado al grupo control. El resto de los terneros fueron distribuidos de acuerdo al peso de la manera más homogénea posible entre grupos. Los animales fueron muestreados el día del inicio del experimento (antes de aplicar los tratamientos) y se les realizaron análisis clínicos, hemograma y hepatograma completo.

Un grupo fue tratado con azitromicina 10 mg/Kg por la vía intravenosa (IV) en forma de bolo. La dosis y la vía de administración fueron tomados de la tesis doctoral del Dr. Estéban Turic, de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) 2010¹⁷⁶. El diseño original contemplaba 1 dosis por día, por 4 días consecutivos. Sin embargo un animal presentó efectos adversos transitorios

(caminar inestable, aturdimiento), recuperándose en pocos segundos sin ninguna intervención veterinaria adicional. De modo que los 3 animales del grupo recibieron la primera dosis por vía IV el primer día, pasándose a la vía oral para los días siguientes. El esquema oral fue de un gramo por animal por día.

Otro grupo recibió adyuvante oleoso provisto por la empresa Agropharma Salud Animal S.A., 2 ml en la tabla del cuello, una única dosis el día de iniciado el experimento. El tercer grupo control permaneció sin tratamiento. Al día siguiente de concluidos los tratamientos, es decir, al 5° día de iniciado el experimento y al 7° día, se extrajo sangre tanto para realizar análisis clínicos como para purificar células. Todos los procedimientos se realizaron bajo la supervisión de la veterinaria del Campo Experimental y con protocolo de bienestar animal aprobado (protocolo n° 13/2021 CICUAE - INTA).

Día	1	2	3	4	5	7
Azitromicina (n = 3) 10 mg/Kg [100 mg/ml] IV, 1 g oral	X; IV	oral	oral	oral	X	X
Adyuvante oleoso (n = 3) 2 ml	X; IM				X	X
Control (n = 3)					X	X

Tabla M6. Cronología, tratamientos y grupos experimentales del experimento realizado en bovinos. X: toma de muestras; IV: tratamiento intravenoso; IM: tratamiento intramuscular.

Sobre las muestras de suero se realizó determinación de citoquinas bovinas TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IFN- γ los días 1, 5 y 7 y actividad arginasa solamente el día 5.

Se purificaron células los días 5 y 7. El día 5 se purificaron CMSP y se las infectó *ex vivo* con 98-124 a una MOI = 2. Se determinó replicación intracelular por NS3 y producción de partículas virales nuevas del sobrenadante de cultivo a las 24 hpi. Este día se sembraron parte de las células para obtener M ϕ -Mo los cuales fueron incubados por 8 días adicionales a 37 °C, 5 % CO₂ para permitir su diferenciación. Sobre estas células se determinó la actividad arginasa. Un conjunto de réplicas fue infectados *ex vivo* con 98-124 a una MOI = 2 (o bien se les practicó infección simulada). A las 24 hpi se cosecharon, determinándose replicación intracelular por NS3. El día 7 se purificaron M ϕ -Mo siguiendo el mismo protocolo que para los que fueron purificados el día 5 y realizándose las mismas determinaciones. La cronología del experimento, los grupos experimentales y tratamientos se resumen en la **Tabla M6**. Las muestras generadas y las determinaciones realizadas se muestran en la **Tabla M7**.

Día	1	5	7
Análisis clínicos	Hemograma Hepatograma	Hemograma Hepatograma	Hemograma Hepatograma
Determinaciones	Citoquinas Arginasa en suero	Citoquinas	Citoquinas
CMSP infección <i>ex vivo</i> (1 día de cultivo)	-	NS3 y titulación	-
Mφ-Mo infección <i>ex vivo</i> (9 días de cultivo)	-	Arginasa y NS3 24 hpi	Arginasa y NS3 24 hpi

Tabla M7. Muestras generadas en el experimento realizado en bovinos.

2.18. Estadística

Se utilizó el ANOVA de 1 o de 2 vías siempre que los datos obtenidos cumplieran con una distribución normal (Test de Normalidad de Wilk-Shapiro) y sus varianzas fueron comparables (Test de Bartlett). Las diferencias entre grupos experimentales se determinan por un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Este es el caso, por ejemplo, del análisis de células incubadas con diferentes concentraciones de E2r y la medición de NS3 en cada caso. Para el ANOVA de 1 factor se utilizó el test de Tukey para comparaciones múltiples.

En los casos en los cuales el número de datos no fue suficiente para comprobar la distribución normal de los datos, el análisis de las diferencias fue realizado utilizando métodos no paramétricos: Mann-Whitney para comparaciones entre 2 grupos o Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples. En caso de encontrar diferencias significativas en la prueba de Kruskal-Wallis, se realizó la prueba de Dunns que realiza comparaciones por pares entre cada grupo independiente e indica qué grupos son significativamente diferentes desde el punto de vista estadístico.

Para examinar la significancia estadística de la asociación entre niveles altos o bajos de arginasa, y tasa alta o baja de replicación viral como variables categóricas en una tabla de contingencia de 2 x 2 con pocos datos, utilizamos la prueba exacta de Fisher. El valor de p de la prueba se calcula como si los márgenes de la tabla fueran fijos y por lo tanto proporciona conjeturas con el número correcto en cada categoría, lo que conduce bajo una hipótesis nula de independencia a una distribución hipergeométrica de los números en las celdas de la tabla. Los análisis fueron realizados mediante el software estadístico InfoStat/L (Córdoba, Argentina) y Graphpad Prism versión 5 (EEUU). En todos los casos se estableció un intervalo de confianza

mínimo del 95 % (con la única excepción de una prueba de Fisher donde la limitación de datos no permitían utilizar este nivel de confianza).

La concentración inhibitoria del 50 % de la infección (CI50 %) por ml¹⁷⁷, hace referencia a la concentración de un componente que es requerida para inhibir el 50 % del crecimiento del virus. Para calcularla, se realizó el análisis estadístico mediante regresiones lineales y los modelos Gompertz logístico y polinómico (regresiones no lineales), para establecer la relación entre la concentración de las distintas moléculas inhibitorias (x), con el porcentaje de inhibición (y) y se obtuvieron las respectivas ecuaciones. Con dichas ecuaciones se calcularon los valores de la CI50 % interpolando el valor correspondiente a la mitad del promedio de los valores del control de virus.

Los datos se grafican como el valor medio del parámetro determinado \pm el error estándar de la media.

3. RESULTADOS

Capítulo 1 - Interacción del BVDV con células inmunes bovinas

Objetivos

1: Establecer el tropismo, la cinética de replicación del BVDV sobre CMSP y la expresión de citoquinas inducidas por la infección.

Introducción

Con el objetivo de establecer la interacción entre el BVDV y las células inmunes bovinas, se estudió en primer lugar la replicación del BVDV en CMSP con dos cepas ncp de genotipo 2 de diferente virulencia. Utilizamos una cepa de referencia de alta virulencia (NY-93) y otra de baja virulencia (98-124) que corresponde a un aislamiento local que ha sido caracterizada por nuestro grupo²². Luego, con la cepa argentina estudiamos la inducción de citoquinas provocadas por la infección, y el tropismo del BVDV en CMSP.

3.1. Resultados

3.1.1. Replicación del BVDV en células mononucleares de sangre periférica

Se purificaron CMSP de 3 bovinos adultos. Los cultivos fueron infectados *ex vivo* con las cepas de genotipo 2 de BVDV NY-93 de alta virulencia y la cepa 98-124 de baja virulencia con una MOI = 2, o bien se les practicó infección simulada para el control. Los sobrenadantes fueron cosechados a distintos tiempos post-infección y se purificó el ARN total. Sobre la muestra se realizó una RT-qPCR con cebadores diseñados para detectar BVDV (**Figura 1.1A**). La cepa de baja virulencia 98-124 produjo un pico a las 24 hpi que se mantuvo constante hasta las 144 hpi. Estos valores fueron significativamente superiores a los de NY-93 desde las 24 hasta las 144 hpi ($p < 0,05$). NY-93 produjo una cinética alcanzando un pico a las 144 hpi.

3.1.2. Expresión de citoquinas

Se extrajo ARN total de las CMSP infectadas a las 24 hpi. Este tiempo fue elegido por representar el pico de replicación viral para la cepa 98-124 que es la cepa utilizada a lo largo de la tesis. Sobre el ARN se realizó una RT-qPCR utilizando cebadores específicos para amplificar las citoquinas TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12 y los IFN de tipo I-II y III (IFN- α , IFN- γ e IFN- λ , respectivamente). La expresión de citoquinas se representa como cambio relativo a la expresión respecto a la infección simulada "Mock". Se observó regulación negativa para las citoquinas TNF- α , IL-10, IFN- α , IFN- γ e IL-6 en CMSP infectadas con ambas cepas. IFN- λ e IL-12 se regulan positivamente en 98-124 ($p < 0,05$), mientras que en NY-93, IFN- λ se regula negativamente y la expresión de IL-12 no se modifica de manera significativa (**Figura 1.1B**).

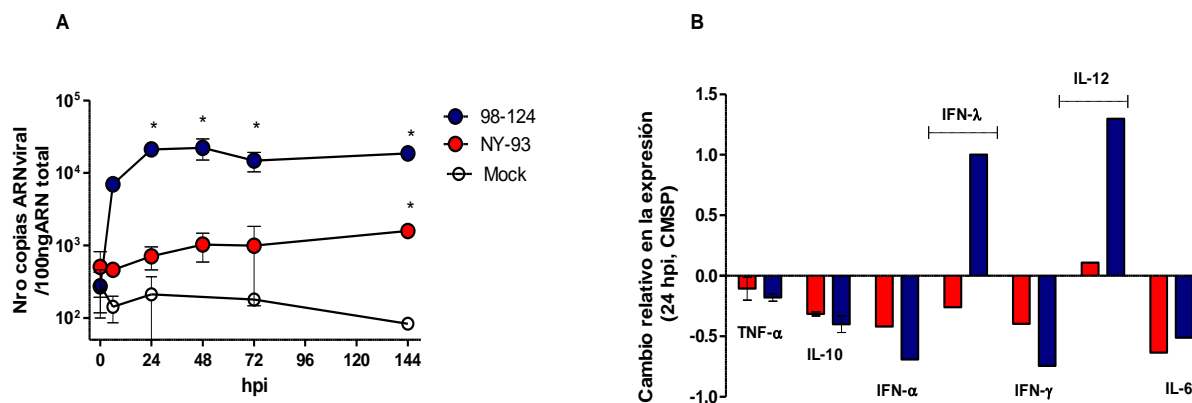


Figura 1.1. Cinética de replicación de un ciclo y expresión de citoquinas en CMSP infectadas con las cepas ncp de BVDV-2 98-124 (azul) y NY-93 (rojo). (A): cuantificación del número de copias de genoma viral extracelular en CMSP infectadas con 98-124 y NY-93 a MOI = 2, y Mock, determinado por RT-qPCR. Datos de 3 experimentos independientes. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$). (B): cuantificación de la expresión de citoquinas mediante RT-qPCR en CMSP bovinos infectados con ambas cepas. Los resultados se expresan como cambios relativos respecto al Mock utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y β -actina como gen normalizador. Las determinaciones fueron obtenidas de 3 experimentos independientes.

En otro experimento similar, se purificaron CMSP de 3 animales y se infectaron *ex vivo* con BVDV 98-124 a una alta y baja MOI (2 y 0,2, respectivamente), con 98-124 inactivado a una MOI = 2, o bien se les practicó infección simulada para el control. La secreción de las citoquinas TNF- α , IL-10, IL-1 β e IFN- γ inducidas por la infección se determinó por ELISA en los sobrenadantes de cultivo. Solamente se obtuvieron resultados detectables para IFN- γ en CMSP infectadas con una MOI = 2, comenzando a detectarse a partir de las 48 hpi. También se determinó la producción de IFNs de tipo I y III mediante el sistema MDBKT2 CAT en estas

células infectadas con MOI = 0,2 y 2 (**Figura 1.2**). Para ambas MOI, la producción de IFN-III es detectada a partir de las 24 hpi y la de IFN-I, más tarde, a partir de las 48 hpi. En la MOI = 0,2, la expresión del IFN de tipo III aumenta hasta las 72 hpi mientras que el IFN-I mantiene valores bajos hasta el último tiempo evaluado de las 72 hpi. En la MOI = 2, la cinética es similar hasta las 48 hpi, sin embargo, cae la producción de IFN-III y crece la producción de IFN-I hasta alcanzar valores similares entre sí a las 72 hpi.

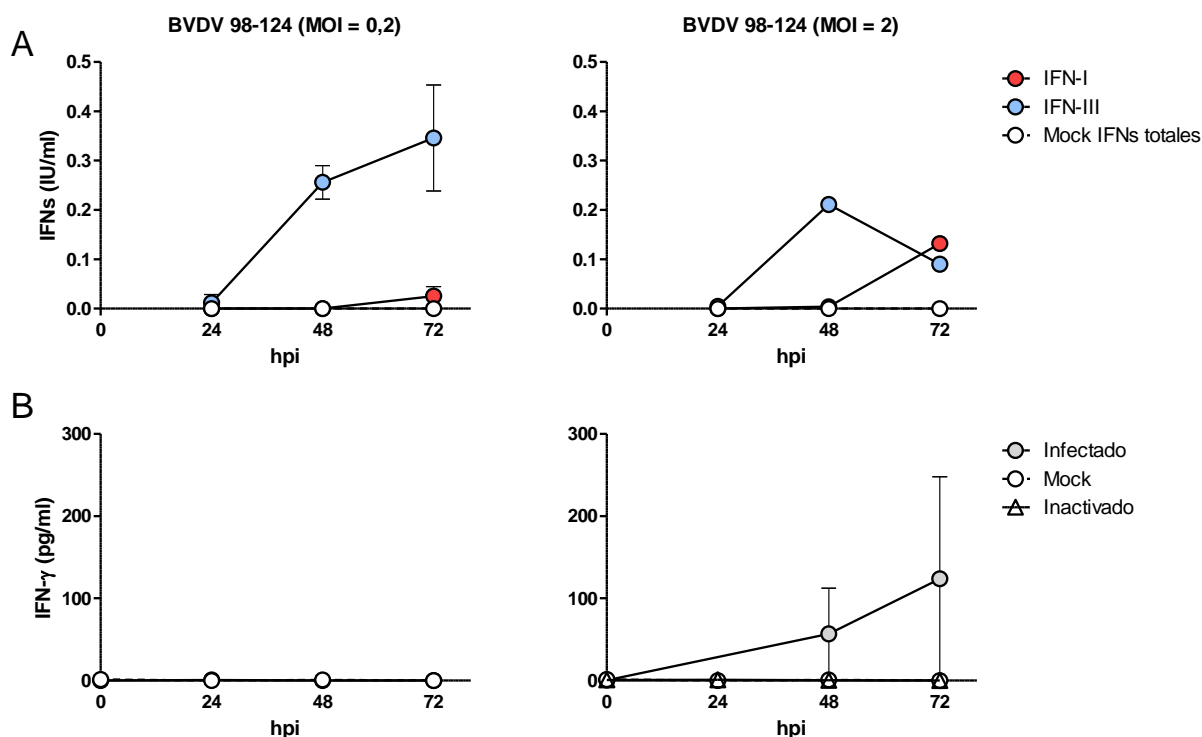


Figura 1.2. Secreción de IFN de tipo I, II y III en CMSP infectadas con BVDV 98-124. (A): producción de IFN-I e IFN-III en CMSP infectadas a MOI = 0,2 (izq.) y MOI = 2 (der.), o bien con infección simulada "Mock". (B): producción de IFN-II en CMSP infectadas con BVDV a MOI = 0,2; MOI = 2, o con infección simulada (Mock) o tratadas con virus inactivado, como se indica. Resultados de 3 experimentos independientes.

3.1.3. Viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica infectadas con el BVDV

Dado que las células infectadas producirían IFN con actividad sobre sí mismas y células vecinas, decidimos establecer si la presencia de IFNs tenía relación con la muerte de linfocitos observada *in vivo*^{22,89,149}. CMSP de 3 bovinos adultos fueron tratadas con IFN- α , IFN- λ o bien se las dejó sin tratamiento por 24 horas. Luego se cosecharon las células y se las incubó con una sonda fluorescente para determinar viabilidad por integridad de membranas. Un tratamiento

adicional consistió en un control positivo de mortalidad celular, las cuáles fueron expuestas a privación de nutrientes (cultivadas con PBS). A otro grupo de células se les realizaron los mismos tratamientos y además se las infectó con BVDV 98-124 MOI = 2 o bien se les practicó una infección simulada. Se las incubó por 24 horas adicionales y se las marcó con la sonda fluorescente. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (**Figura 1.3**).

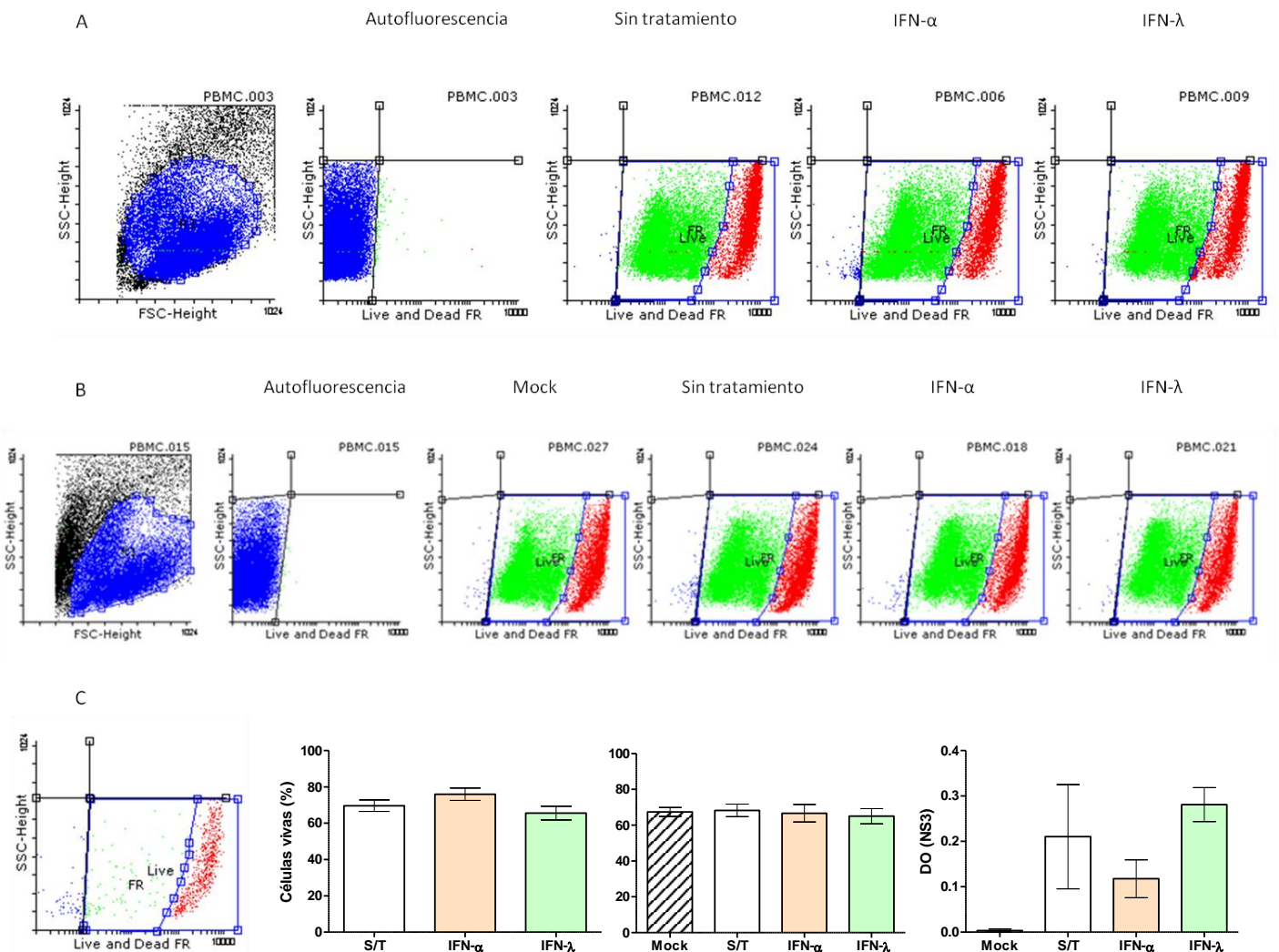


Figura 1.3. Viabilidad de CMSP bovinas tratadas con IFN-α, IFN-λ bovinos e infectadas con el BVDV. Se muestran gráficos de puntos (*dot plots*, del inglés) representativos de CMSP de 1 animal. (A) Viabilidad de CMSP tratadas con IFN-α e IFN-λ o sin tratamiento. (B) Viabilidad de CMSP tratadas con IFN-α e IFN-λ o sin tratamiento e infectadas con el BVDV MOI = 2 (o infección simulada). (C) Se resumen los resultados de los *dot plots* provenientes de 3 experimentos independientes realizados con 3 animales distintos. De izquierda a derecha, control positivo de células muertas, porcentaje de células vivas tratadas con IFNs o sin tratamiento, porcentaje de células vivas tratadas con IFNs e infectadas o Mock, replicación viral en estas células. Resultados de 3 experimentos independientes.

La viabilidad del control de mortalidad celular fue del 12,3 %. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular por efecto de los distintos tratamientos, tampoco hubo diferencias en la viabilidad inducida por la infección viral, ni por la combinación de tratamientos e infección viral. Cuando se seleccionaron los eventos en el *dot plot* se tuvieron en cuenta eventos correspondientes a células vivas y muertas, para evaluar justamente el efecto sobre la viabilidad. La viabilidad en todos los casos se encuentra en torno al 70 % de los eventos en estas condiciones de selección de poblaciones. En cuanto a la replicación viral, esta fue menor en las CMSP tratadas con IFN- α , aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

3.1.4. Puesta a punto de la marcación intracelular del BVDV en células mononucleares de sangre periférica

Con el fin de establecer el tropismo del BVDV en las células inmunes bovinas, se puso a punto la marcación intracelular del virus (**Figura 1.4**) en CMSP utilizando 2 anticuerpos comerciales diferentes. Un anticuerpo policlonal de cerdo conjugado a FITC anti-BVDV, y otro monoclonal que reconoce la proteína NS3 viral también conjugado con FITC.

Se purificaron CMSP de un bovino adulto y se infectaron *ex vivo* con BVDV 98-124 a una MOI = 2, o bien se les practicó infección simulada cultivándose por 24 horas para la marcación con anticuerpos. Este tiempo corresponde al pico de producción viral para BVDV en CMSP establecido previamente. En esta primera aproximación comprobamos que se producía una alta marca inespecífica FITC positiva con ambos anticuerpos, siendo menor con el anticuerpo policlonal (**Figura 1.4A**), lo cual motivó su elección para posteriores experimentos.

Para facilitar la puesta a punto utilizamos la línea celular de riñón bovino MDBK. Estas células fueron infectadas con el BVDV a MOI = 2 y 0,2, dejando un grupo control sin infectar. A las 24 hpi fueron marcadas utilizando el anticuerpo policlonal anti BVDV-FITC de VMRD, obteniéndose una marcación FITC positiva cercana al 90 % en las células infectadas con MOI = 0,2, comparadas con células no infectadas tratadas con el anticuerpo (**Figura 1.4B**).

Se siguieron distintas estrategias con la intención de reducir la marca inespecífica en CMSP. Se realizó un pre-tratamiento de estas células con suero de cerdo inactivado con el objetivo de bloquear los receptores Fc de inmunoglobulinas de las células inmunes bovinas, hipotetizando que el anti-BVDV-FITC producido en cerdo podría estar uniéndose a estos receptores en lugar de al BVDV. Por otro lado, se pre-incubó el anticuerpo con lisado de CMSP con la intención de proporcionar epitopes que secuestren el exceso de anticuerpo para reducir la marca

inespecífica. Se evaluaron menores concentraciones del anticuerpo anti-BVDV-FITC en los 3 tratamientos.

La opción finalmente elegida fue el pre-tratamiento del anticuerpo con lisado de CMSP disminuyendo la concentración de anticuerpo utilizada (**Figura 1.4C**).

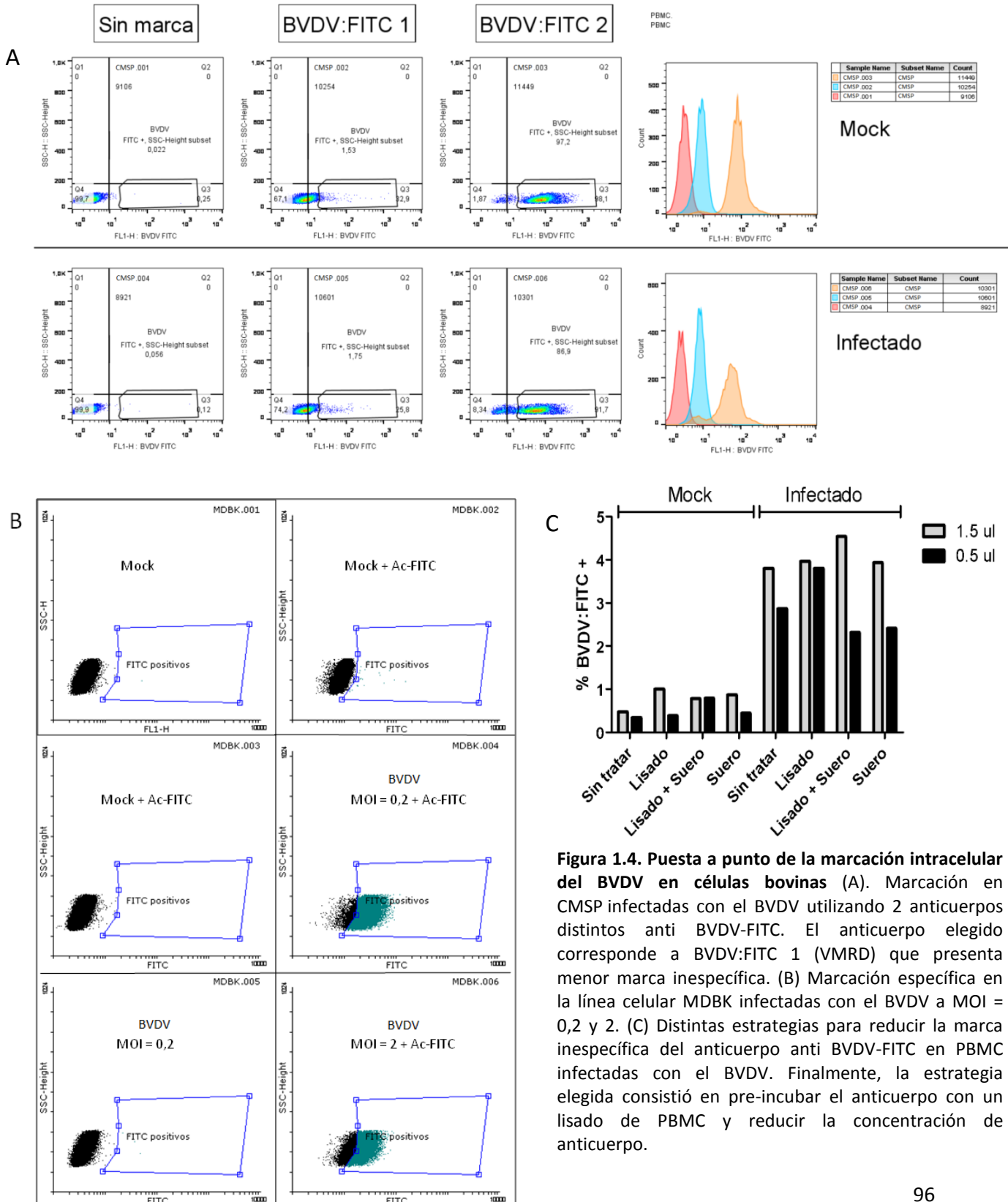


Figura 1.4. Puesta a punto de la marcación intracelular del BVDV en células bovinas (A). Marcación en CMSP infectadas con el BVDV utilizando 2 anticuerpos distintos anti BVDV-FITC. El anticuerpo elegido corresponde a BVDV:FITC 1 (VMRD) que presenta menor marca inespecífica. (B) Marcación específica en la línea celular MDBK infectadas con el BVDV a MOI = 0,2 y 2. (C) Distintas estrategias para reducir la marca inespecífica del anticuerpo anti BVDV-FITC en PBMC infectadas con el BVDV. Finalmente, la estrategia elegida consistió en pre-incubar el anticuerpo con un lisado de PBMC y reducir la concentración de anticuerpo.

3.1.5. Tropismo del BVDV en células mononucleares de sangre periférica

Para estudiar el tropismo del BVDV en CMSP se realizó una marcación intracelular de CMSP utilizando un anticuerpo policlonal anti-BVDV conjugado con FITC. Se purificaron CMSP, se infectaron con BVDV 98-124 a MOI = 2 y 0,2, o bien se les practicó infección simulada para el control, y se incubaron por hasta 72 hpi cosechando las células cada 24 horas. Las células fueron permeabilizadas y marcadas con el anticuerpo anti BVDV para visualizar mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la **Figura 1.5**.

Cuando se considera la región correspondiente a las CMSP excluyendo a las células muertas y restos celulares, se observa una cinética similar a la observada en sobrenadantes de CMSP con una replicación que se mantiene prácticamente constante a partir de las 24 hpi. Al considerar entre las diferentes MOI (2 y 0,2) se observa que a las 24 hpi hay mayor presencia de virus intracelular en la MOI = 2 que en MOI = 0,2 (aunque con mucha variabilidad entre mediciones) y que esta relación se invierte a las 48 y 72 hpi. Cuando se excluye del análisis la región del *plot* correspondiente a Mo, se observa una cinética similar a la observada en CMSP, con mayor replicación cuando se infecta con MOI 2 a las 24 hpi e inversión de esta relación a las 48 y 72 hpi. Sin embargo, la replicación en Mo en valores medios es mayor, sobre todo a las 48 hpi para ambas MOI. Cabe señalar que los Mo son una población minoritaria, constituyendo cerca del 5 % de las CMSP totales; por tanto, las probabilidades de encuentro de las partículas virales con Mo durante la infección, es mucho menor que la de encontrarse con linfocitos, y aun así los Mo se infectan en igual o en mayor proporción que los linfocitos, indicando un evidente tropismo por el linaje monocítico.

En un experimento subsiguiente se verificó el tropismo del BVDV por los distintos linajes de células inmunes. Se purificaron CMSP de 4 animales diferentes las que fueron infectadas *ex vivo*, a una MOI = 2 o 0,2, o bien se les practicó infección simulada como control. La infección prosiguió por 24 horas, tiempo en el que se alcanza el pico de replicación viral. Transcurridas las 24 hpi, se cosecharon las CMSP y se marcaron con la sonda marcadora de viabilidad celular, para excluir células muertas del análisis. Posteriormente se realizó la marcación con anticuerpos anti-CD21 (células B), anti-CD4 (células TCD4), anti-CD8 (células TCD8), y anti-CD172a (línea monocítica; Mo, Mφ y CD). Las CMSP fueron luego permeabilizadas y marcadas intracelularmente con el anticuerpo contra el BVDV y analizadas por citometría de flujo. Los resultados demuestran el tropismo del BVDV por las CPA (**Figura 1.6**) particularmente por el linaje monocítico. Aproximadamente la mitad de los Mo se infectan en el cultivo, seguido por las células B. La infección sobre las TCD8 en ambas MOI es menor al 10 % y casi indetectable en células T-CD4+ (**Figura 1.6B**).

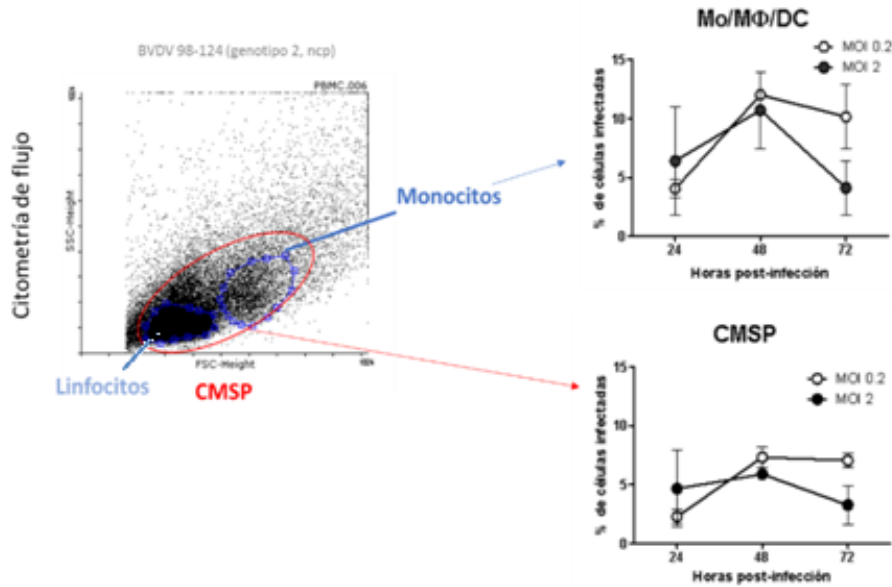


Figura 1.5. Marcación intracelular de BMDM infectadas con BVDV 98-124 con anti-BVDV-FITC. Izquierda: *dot plot*, en rojo se muestra la población de BMDM excluyendo células muertas y fragmentos celulares. En azul están delimitadas las regiones de linfocitos y Mo. Derecha: gráfico correspondiente a la infección del linaje monocítico (arriba) y BMDM (abajo) infectados con MOI = 0,2 y MOI = 2.

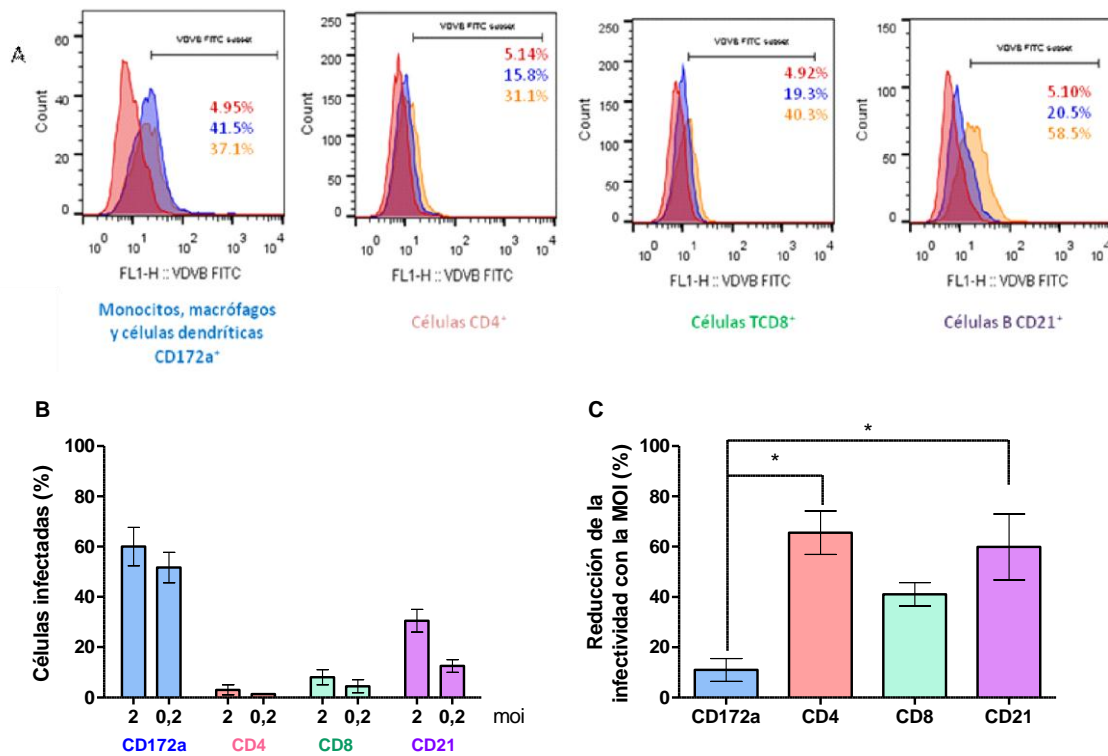


Figura 1.6. Tropismo del BVDV sobre BMDM bovinas. Se purificaron BMDM de 4 animales, se infectaron con el BVDV a MOI = 2, 0,2 y Mock y se cosecharon a las 24 hpi. Las células fueron marcadas con un marcador de viabilidad que permite seleccionar células vivas, con anticuerpos frente a CD21 (células B), CD4 (células TCD4), CD8 (células TCD8), y CD172a (línea monocítica; Mo, Mφ y CD) e intracelularmente frente al BVDV. (A) Histogramas representativos de un experimento. Los porcentajes corresponden a células sin infectar (bordó), células infectadas con MOI = 0,2 (azul) y 2 (naranja). (B) Porcentaje de células infectadas de los diferentes linajes celulares. (C) Porcentaje de reducción cuando se disminuye 10 veces la cantidad de virus, (de MOI = 2 a 0,2). Datos de 4 experimentos independientes. *: Diferencias significativas $p < 0,05$, Kruskal-Wallis 1 vía, seguido del test de Dunns.

La infección preferencial del linaje monocítico resulta más notable si tenemos en cuenta que, como mencionamos más arriba, la línea monocítica es minoritaria entre los leucocitos.

Además, cuando se reduce 10 veces la MOI, el porcentaje de reducción de células infectadas resulta significativamente menor ($p < 0,05$) en la línea monocítica (**Figura 1.6C**). Esto implica que durante la infección *ex vivo*, aún con menor cantidad de virus disponible, se mantiene casi intacta su capacidad infectiva sobre este linaje y no sobre los otros estudiados.

3.1.6. Conclusiones parciales

- El BVDV 98-124 infecta CMSP con un pico de replicación a las 24 hpi en una infección en un ciclo.
- La infección *ex vivo* de CMSP con 98-124 indujo expresión diferencial de citoquinas e IFNs.
- Los IFNs aplicados de manera exógena no modificaron la viabilidad de las células.
- El BVDV posee un tropismo preferencial por las CPA, principalmente por células del linaje monocítico.

Capítulo 2 - Interacción del BVDV con los macrófagos bovinos

Objetivos

2: Estudiar la capacidad del BVDV de infectar M ϕ -Mo bovinos en cultivos primarios.

Introducción

En el primer capítulo establecimos que el BVDV infecta preferentemente al linaje monocítico dentro de las CMSP. Nuestro grupo ya había estudiado el rol de las CD en inmunopatogenia viral⁸¹, sin embargo, la interacción del BVDV con los M ϕ bovinos no había sido abordada en profundidad.

3.2. Resultados

3.2.1. Purificación de Monocitos

Como se señaló en el apartado “Materiales y Métodos”, existen dos formas de producir cultivos primarios bovinos de M ϕ -Mo a partir de CMSP. Brevemente, una opción es purificar Mo por su adherencia diferencial en placa de cultivos^{129–131,158–160}. Otra técnica procede a la separación por selección positiva de células CD14+ basada en la tecnología MACS^{116,117,125–128} (ver metodología para más detalles). CD14 es una glicoproteína de superficie de tipo II que se expresa preferencialmente en Mo y M ϕ . La purificación por afinidad (selección positiva) permite obtener una población de Mo con alta pureza, pero es una metodología laboriosa y costosa, difícil de aplicar en aquellos experimentos que involucran numerosos tratamientos y animales. Resultaba entonces de interés estimar el porcentaje de células CD14+ purificadas por adherencia para verificar si se trataba de poblaciones equivalentes. Se purificaron por tanto M ϕ -Mo por adherencia y se marcaron con un anticuerpo anti CD14-FITC. Prácticamente el 99 % de los M ϕ -Mo obtenidos mediante adherencia fueron CD14+ (**Figura 2.1A**). En otro experimento se verificó la pureza de un cultivo de M ϕ -Mo purificados por la tecnología MACS, resultando las células 99 % CD14+ (**Figura 2.1B**). Estos resultados indican que por ambas metodologías obtenemos un 99 % de M ϕ -Mo CD14+. En adelante, en los experimentos donde utilizemos M ϕ -Mo purificados por adherencia diferencial, nos referiremos a ellos como M ϕ -Mo adherentes.

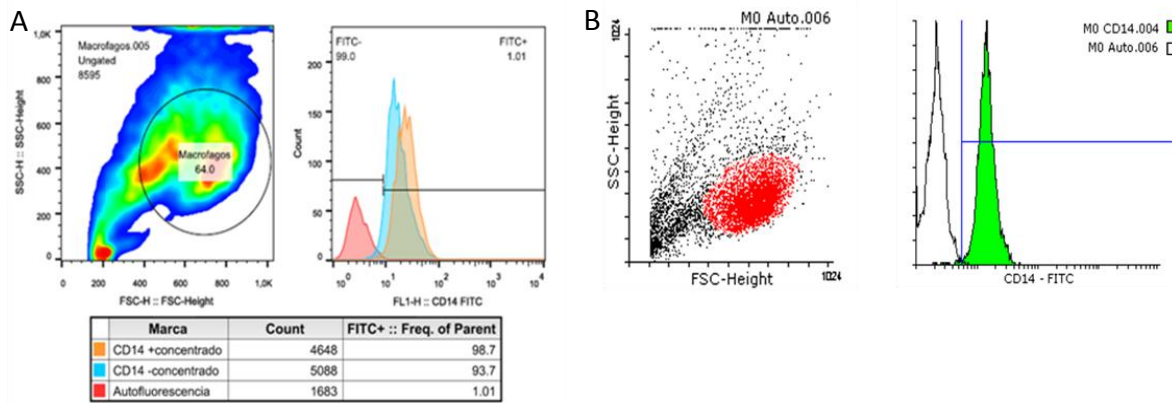


Figura 2.1. Marcación de Mφ-Mo por adherencia diferencial y por sistema MACS. (A) Mφ-Mo purificados por adherencia marcados con un anticuerpo anti CD14-FITC en dos concentraciones distintas. (B) Marcación CD14-FITC de Mφ-Mo purificados por la tecnología MACS.

3.2.2. Cinética de replicación del BVDV en macrófagos bovinos

En el capítulo anterior establecimos que el linaje monocítico es susceptible a la infección por el BVDV. Estudiamos entonces la cinética de replicación viral en un ciclo en Mφ-Mo. Se diferenciaron Mφ-Mo y se infectaron con el BVDV-98-124 (genotipo 2, ncp) con una MOI = 2, o bien se les practicó una infección simulada y se las cosechó en distintos tiempos.

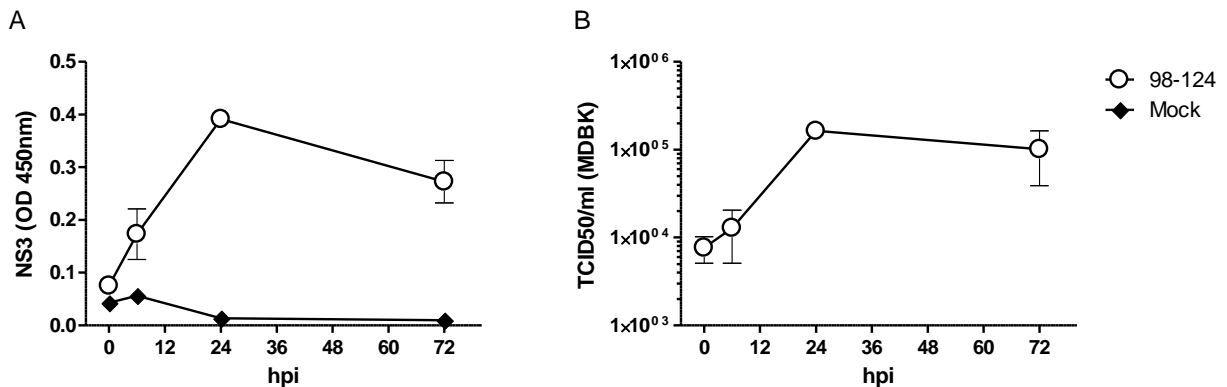


Figura. 2.2. Cinética de replicación viral de un ciclo en Mφ-Mo infectados con 98-124 MOI = 2. Replicación intracelular (A) medida por producción de la proteína no estructural NS3 por ELISA; y producción de virus infeccioso extracelular titulado en células MDBK (B).

Se utilizó un ELISA comercial para detectar la proteína viral NS3 intracelular, utilizada como marcador de replicación viral. Los sobrenadantes fueron cosechados, determinándose la producción de virus infeccioso extracelular mediante microtitulación (**Figura 2.2**). Se observa una cinética similar tanto para replicación intracelular como para producción de virus infeccioso

extracelular con un pico a las 24 hpi y una ligera caída de la producción de NS3 hacia las 72 hpi, indicando el final del ciclo replicativo.

3.2.3. Evaluación del rol de la glicoproteína E2 de la envoltura viral en mediar la entrada del virus a los macrófagos

Hemos demostrado que el linaje monocítico constituye la mayoría de las células involucradas en la captación inicial de virus en CMSP cultivadas *ex vivo*. El BVDV infecta las células epiteliales y las CD mediante la unión de la proteína E2 a la superficie celular⁸¹. Estudiamos entonces si la glicoproteína E2 media el ingreso del BVDV a los Mφ bovinos. Para realizar este estudio trabajamos con E2r y anticuerpos específicos.

3.2.3.1. Producción de la glicoproteína recombinante E2 de BVDV

Se produjo la glicoproteína E2 de la envoltura viral de BVDV en el sistema baculovirus - células de insecto utilizando la línea celular SF9-BIR. El sistema de producción se detalla en la metodología. El mismo permite la producción de la proteína E2r conjugada con biotina en el sobrenadante de cultivo¹⁶⁷. En primera instancia se amplificó el baculovirus recombinante obteniendo un título de $2,8 \times 10^8$ TCID₅₀/ml. Este fue inoculado sobre células SF9-BIR con una MOI = 5 y se cosecharon los sobrenadantes a los 3 días.

Se evaluó la producción de E2r mediante WB detectándose la proteína E2, pero sin detectarse la proteína biotinilada. Se realizaron entonces ensayos ELISA en células revelando con avidina peroxidasa, pero en todos los casos no se detectó la muestra biotinilada. Concluimos entonces que la proteína fue producida correctamente, pero que no se encontraba biotinilada. La producción se cuantificó mediante un *in house* ELISA como se describió en la metodología, obteniéndose un rendimiento de 20 µg/ml.

3.2.3.2. Actividad biológica de E2 recombinante: ensayos de inhibición competitiva

Para evaluar la actividad biológica de E2r, se realizaron ensayos de inhibición competitiva de la infección por el BVDV en células de línea MDBK. La estrategia consistió en pre-incubar células MDBK con diluciones seriadas de la producción de E2r (rango de 0,5 a 256 ng/ml) para permitir

la adsorción a la superficie celular, bloqueando receptores para el BVDV. Luego se infectó el cultivo con la cepa Singer cp a una MOI = 0,01, revelándose por tinción con cristal violeta a las 96 hpi. Se incluyeron los controles positivos de células infectadas con BVDV sin E2r añadida y controles negativos de células sin infectar y sin E2r. A estos últimos se les asignó un valor de 100 %. Se añadieron además pre-incubaciones con sobrenadante de SF9-biotina (sin producción de E2r) y se infectaron con el BVDV, para asegurarse que la inhibición del ecp era exclusivamente provocada por la presencia de E2r. Se incluyeron también controles de toxicidad, es decir, células incubadas con las concentraciones más altas de E2r y del sobrenadante de SF9-biotina, sin infectar con el BVDV, para asegurarse que la producción de E2r o los controles no inducían por sí mismos muerte celular.

Se observó una inhibición del ecp viral dependiente de la dilución de E2r (**Figura 2.3**). No se observó toxicidad por E2r, ni por el sobrenadante de SF9, ni inhibición inespecífica del ecp por el sobrenadante de SF9 (sin E2r).

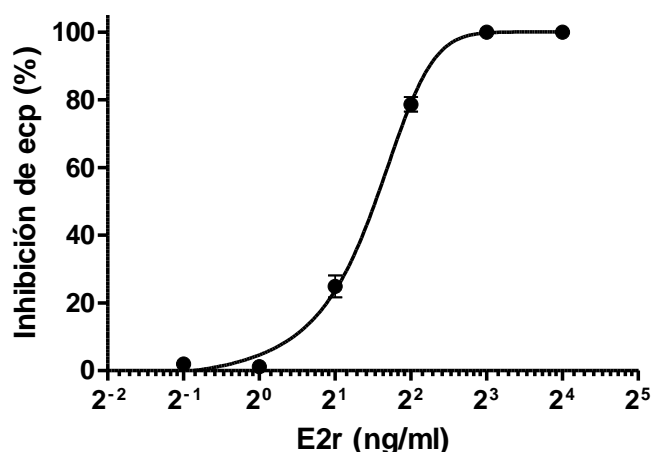


Figura 2.3. Ensayos de inhibición del ecp del BVDV por competencia de E2r. Se pre-incubaron células MDBK con diluciones de E2r y luego se infectaron con el BVDV a una MOI de 0,01. A los controles de células sin infectar y sin E2r se les asignó un valor de 100 %. Se muestra el rango de diluciones de 0,5 a 8 ng/ml Resultados de 3 experimentos independientes.

3.2.3.3. *Entrada del BVDV sobre los macrófagos derivados de monocitos*

Teniendo en cuenta el tropismo del BVDV sobre el linaje monocítico, se decidió explorar cómo ocurre la entrada del BVDV a los Mφ-Mo. Dados nuestros antecedentes, E2r era nuestro mejor candidato para bloquear la entrada del virus, puesto que demostramos que es capaz de inhibir completamente la entrada del virus en las CD⁸¹.

Se diferenciaron entonces M ϕ -Mo y se realizaron distintos pre-tratamientos de inhibición competitiva antes de infectarlos con el BVDV a una MOI = 2 (o bien realizar infección simulada). Los pre-tratamientos sobre las células consistieron en distintas concentraciones de proteína E2r y un anticuerpo anti-DC SIGN.

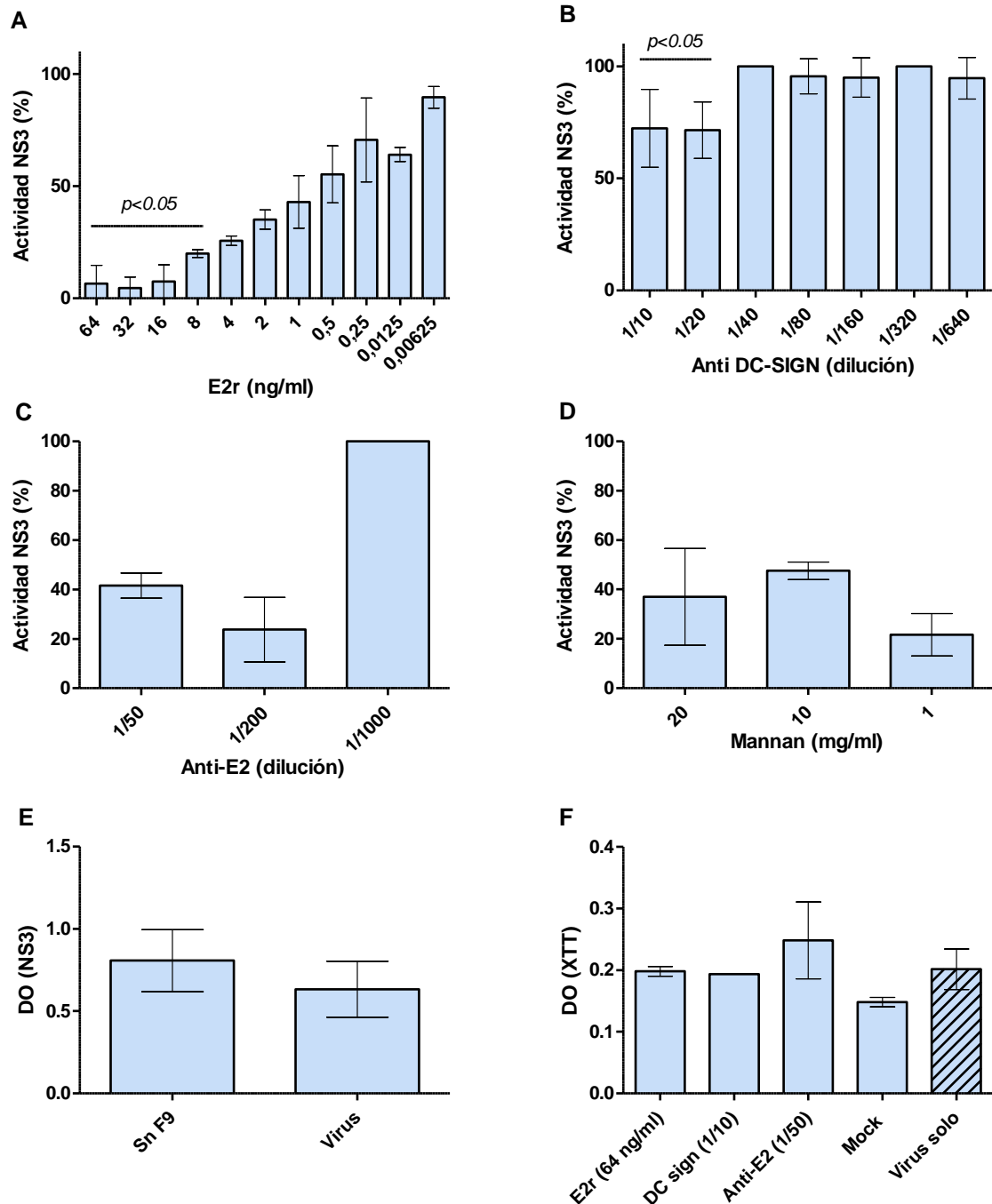


Figura 2.4. Inhibición de la infección por E2r en M ϕ -Mo. Se grafica la infección porcentual como actividad NS3 (%) normalizando la DO de Mock como 100 % (A - D). Actividad NS3 (%) de M ϕ -Mo pre-tratados con E2r (A), DC-SIGN (B), anticuerpo anti-E2, (C), y Mannan (D). Se añadieron controles de infección en células pretratadas con sobrenadante de SF9 (E), y se analizó la viabilidad de células expuestas a las máximas concentraciones de los tratamientos aplicados mediante ensayo XTT (F). Resultados de 3 experimentos independientes. Se indican las diferencias significativas con una confianza del 95 % aplicando el test de Kruskal-Wallis, seguido del test de Dunns para comparaciones múltiples.

DC-SIGN es un receptor utilizado para entrar a las células por otros virus que infectan $M\phi$ ^{178,179}. Para verificar la especificidad del efecto, el inóculo viral fue pre-tratado previamente a la infección con un anticuerpo monoclonal anti E2. Tras la infección, las células fueron incubadas 24 horas y se evaluó la replicación viral por la presencia de la proteína NS3.

Se realizaron 3 experimentos independientes evaluando la concentración de E2r hasta un valor máximo de 64 ng/ml. Se observó un efecto inhibitorio dependiente de la dosis, que fue significativo hasta los 16 ng/ml, con una reducción de la infección de entre 80 y 96 %. ($p < 0,05$) (**Figura 2.4A**). El anticuerpo anti-E2 utilizado también inhibió parcialmente la entrada del BVDV en los $M\phi$ -Mo (**Figura 2.4C**). Paradójicamente la dilución 1/50 mostró un valor medio de replicación mayor, aunque la diferencia no es significativa respecto de la dilución 1/200. Posiblemente esta dilución 1/200 aún sea saturante y sea necesario diluir más para observar un efecto dilución dependiente. Esta reducción corrobora la especificidad del efecto de la glicoproteína E2 observado. Se evaluó el efecto de los sobrenadantes de cultivo de la línea SF9 infectada con baculovirus *wild type* sobre la replicación viral. Esta no se vio afectada por este tratamiento, comprobando de este modo que el efecto inhibitorio en la replicación se debe exclusivamente a la inhibición causada por la E2r (**Figura 2.4E**). Tampoco se vio afectada la tasa metabólica de los $M\phi$ -Mo (determinada por ensayo XTT) con la infección ni con los distintos tratamientos a las máximas concentraciones utilizadas (**Figura 2.4F**).

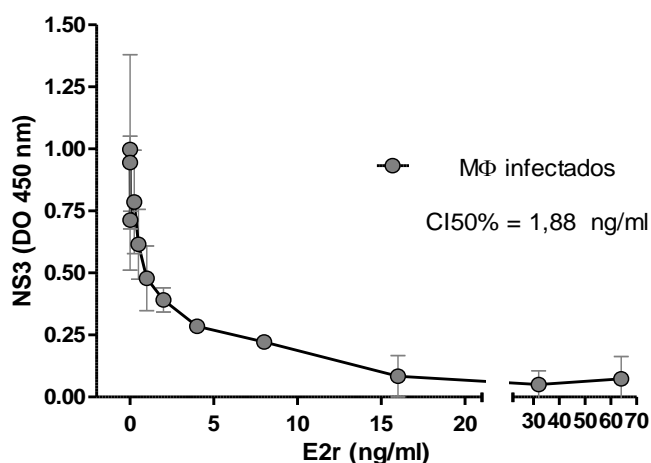


Figura 2.5. Inhibición de la infección por E2r en $M\phi$ -Mo. Se grafican valores de DO promedio \pm desvío estándar. Las mediciones se realizaron por triplicado. Resultados de 3 experimentos independientes. El valor de R2 de la curva realizada para calcular la CI50 % fue 0,95.

El tratamiento de las células con un anticuerpo anti-DC-SIGN redujo la infección en un 20 % (**Figura 2.4B**) indicando que DC-SIGN estaría involucrado en el pegado del BVDV a los $M\phi$ -Mo, pero no sería el único mecanismo. Ensayos realizados utilizando mananos mostraron una caída

no significativa en el valor medio de replicación en la concentración de 1 mg/ml (**Figura 2.4D**), aunque no se pudo demostrar un efecto dosis-dependiente y hubo datos con mucha variación. No se puede descartar que las concentraciones utilizadas sean subóptimas para causar efectos más acentuados en la replicación. Debe considerarse que estos receptores pueden ser indirectos, es decir, podrían facilitar la adsorción viral a la superficie celular, pero no necesariamente participan en la internalización. Para verificar el rol de E2 en la entrada del virus a las células calculamos CI50 % de E2r en M ϕ -Mo (**Figura 2.5**). El valor obtenido fue de 1,88 ng/ml.

3.2.4. Conclusiones parciales

- El BVDV 98-124 infecta M ϕ -Mo con un pico de replicación en torno a las 24 hpi en una infección en un ciclo.
- Los cultivos de M ϕ -Mo purificados por la tecnología MACS o adherencia diferencial son equivalentes en cuanto a la expresión de la molécula CD14.
- Produjimos la proteína E2r de BVDV con actividad biológica capaz de inhibir la infección por el BVDV en células susceptibles.
- La glicoproteína E2 participa en el proceso de entrada del BVDV a los M ϕ -Mo; y tanto DC-SIGN como el receptor de manosa podrían estar involucrados en el pegado de la partícula viral a la superficie celular.

Capítulo 3 - Interacción del BVDV con macrófagos derivados de monocitos perfilados

Objetivos

- 2: Estudiar la capacidad del BVDV de infectar M ϕ -Mo bovinos en cultivos primarios.
- 3: Establecer si existen diferencias en la cinética de replicación del BVDV en M ϕ -Mo bovinos de distinto fenotipo y en la inmunomodulación ejercida por el virus.

Introducción

La interacción de los M ϕ con el BVDV se ha estudiado *in vitro*^{26,49,147,148,79,119,120,142-146} e *in vivo*^{89,149,150}. No obstante, los estudios publicados han considerado a los M ϕ como una población homogénea, sin atender a los perfiles funcionales que presentan estas células al momento de la infección y/o a los que se inducen por efecto de la infección. Los siguientes experimentos tienen como objetivo intentar dilucidar el rol de la interacción del BVDV con los distintos perfiles de M ϕ , los cuales fueron inducidos en cultivos primarios *ex vivo*.

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterización de macrófagos derivados de monocitos perfilados *ex vivo*

3.3.1.1. Producción de citoquinas, IFNs y actividad arginasa en macrófagos derivados de monocitos perfilados

Al momento de infectar una célula los virus monocitotrópicos pueden encontrarse en su entorno con M ϕ de diferentes perfiles funcionales. Con el objetivo de emular los perfiles clásicos o alternativos de M ϕ *in vitro* se diferenciaron M ϕ -Mo y se estimularon con LPS para inducir un perfil proinflamatorio "M1", con IL-4 para inducir un perfil "M2" alternativo, e IFN- α para inducir un perfil de M ϕ antiviral, al que denominamos "M α ". Se determinó la producción de TNF- α , IL-10 en sobrenadantes de cultivo a las 96 horas de iniciado el tratamiento y actividad arginasa en las células. Encontramos que el perfil M ϕ estimulados con LPS induce una cantidad significativamente mayor de TNF- α y significativamente menor de IL-10 ($p < 0,05$ en ambos casos). Mientras que la actividad arginasa en células se vio significativamente

aumentada ($p < 0,05$) en el perfil M-IL-4 (**Figura 3.1**). De esta forma verificamos que podemos lograr desarrollar perfiles funcionales en los M ϕ cultivados *ex vivo*.

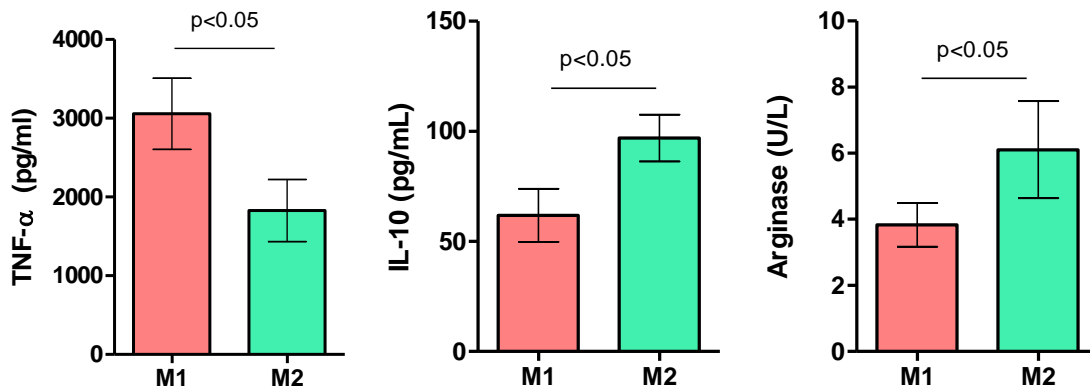


Figura 3.1. Producción de TNF- α e IL-10 en sobrenadantes de cultivo y actividad arginasa en células de M ϕ -Mo perfilados. Se estimularon M ϕ -Mo con LPS (M1) e IL-4 (M2) por 24 horas y se determinó TNF- α (A) e IL-10 (B) en sobrenadantes de cultivo por ELISA y actividad arginasa (C) en las células por un ensayo colorimétrico. Experimentos realizados por cuadruplicado. Diferencias significativas ($p < 0,05$) aplicando el test U de Mann Whitney.

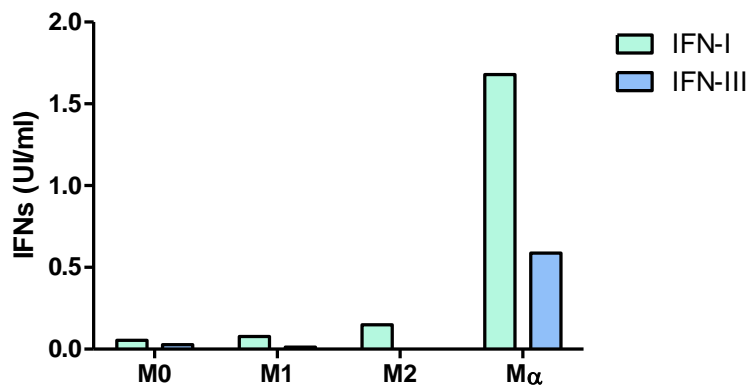


Fig. 3.2. Producción de IFN-I e IFN-III en M ϕ -Mo perfilados. Se estimularon M ϕ -Mo con medio de cultivo (M0), LPS (M1), IL-4 (M2) e IFN- α (M α) por 24 horas y se determinó la presencia de IFN-I e IFN-III. Resultados de un único experimento.

Se evaluó además la producción de IFN-I e IFN-III mediante el sistema MDBKT2 CAT-ELISA en los sobrenadantes de cultivos de los M ϕ -Mo perfilados. Ambos tipos de IFNs se mantuvieron en niveles casi indetectables, apenas por encima del punto de corte establecido en el ensayo. Como era de esperar, se detectó la presencia de IFN-I en M ϕ M α , dado que este corresponde al que se agrega de manera exógena para perfilar a estas células (**Figura 3.2**). Resulta relevante que el aporte exógeno de IFN-I, induzca a la vez la producción de IFN-III.

3.3.1.2. Caracterización de marcadores de superficie en macrófagos derivados de monocitos

En estos cultivos de M ϕ -Mo perfilados con LPS, IL4 e IFN- α , se caracterizaron los marcadores de superficie CD14, CD205, CD172a, MHC-I y CD86. Para ello se cosecharon las células y se marcaron con los anticuerpos que reconocen estos marcadores de superficie conjugados con fluorocromos y se visualizaron por citometría de flujo. Se realizaron 4 experimentos independientes. Considerando el porcentaje de células marcadas con cada anticuerpo, no se observaron diferencias significativas con los tratamientos aplicados (**Tabla 3.1**).

	CD14	CD205	CD172a	MHC-I	CD86
Mo	96,5 \pm 2,1	57,5 \pm 3,5	99,0 \pm 1,4	98,0 \pm 1,4	95,7 \pm 5,8
M1	94,5 \pm 3,5	57,7 \pm 10,7	99,0 \pm 1,7	97,0 \pm 1,4	72,3 \pm 26,3
M2	88,0 \pm 2,8	56,7 \pm 22,4	99,3 \pm 0,6	96,5 \pm 0,7	60,7 \pm 26,9
M α	95,0 \pm 5,7	56,7 \pm 6,0	98,0 \pm 2,6	95,0 \pm 4,2	58,3 \pm 23,2

Tabla 3.1. Marcadores de superficie en M ϕ -Mo perfilados. Se estimularon M ϕ -Mo con LPS (M1), IL-4 (M2), IFN- α (M α) o con medio de cultivo (M0) por 24 horas y se evaluaron por citometría los marcadores de superficie CD14, CD205, CD172a, MHC-I y CD86. Los resultados se expresan como porcentaje de células marcadas \pm desvío estándar. Experimentos realizados con células provenientes de 4 animales

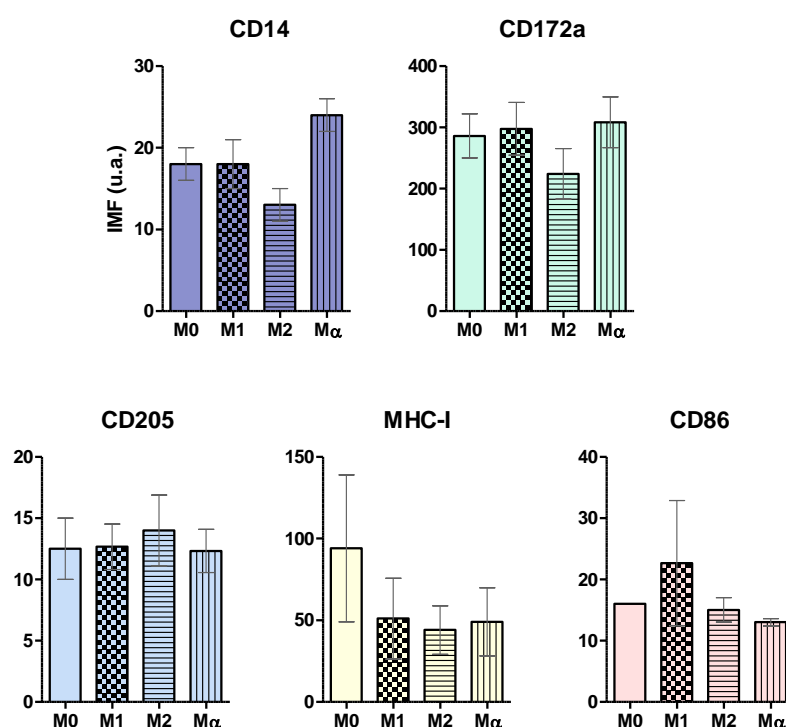


Figura 3.3. Marcadores de superficie en M ϕ -Mo perfilados. Se estimularon M ϕ -Mo con LPS (M1), IL-4 (M2), IFN- α (M α) o con medio de cultivo (M0) por 24 horas y se evaluaron por citometría los marcadores de superficie CD14, CD205, CD172a, MHC-I y CD86. Los resultados se expresan como IMF. Experimentos realizados con células provenientes de 4 animales

Cuando consideramos el nivel de expresión por célula analizando la intensidad de fluorescencia media (IFM) se observó que la expresión de la molécula coestimuladora CD86 tiende a aumentar en Mφ M1 aunque con considerable dispersión. Todos los tratamientos disminuyeron el valor medio de la IFM de MHC-I (respecto a los M0). En las células tratadas con IL-4 se observó una caída en el valor medio de la IFM de CD14 y CD172a y un aumento leve en el marcador CD205 (**Figura 3.3**). Sin embargo ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa. Debe tenerse en cuenta que los experimentos fueron llevados a cabo en Mφ-Mo provenientes de 4 animales diferentes, en una situación de campo. Probablemente, para encontrar diferencias significativas deberíamos aumentar considerablemente el número de animales involucrados.

3.3.1.3. Actividad fagocítica de macrófagos derivados de monocitos perfilados

La actividad fagocítica de los Mφ varía según su perfil. Varios estudios sostienen que los Mφ M2 tienen mayor actividad fagocítica que los Mφ M1^{107,180,181}. Para evaluar la actividad fagocítica de los Mφ-Mo bovinos que recibieron diferentes tratamientos, realizamos un ensayo que consiste en exponer a los cultivos primarios de Mφ-Mo perfilados a una suspensión bacteriana sensible a gentamicina para permitir la fagocitosis, y una vez que ésta tiene lugar, se retiran por lavado y se eliminan con gentamicina aquellas bacterias no fagocitadas. Posteriormente se lisan los Mφ liberando a las bacterias intracelulares y determinando sobre estas las UFC/ml.

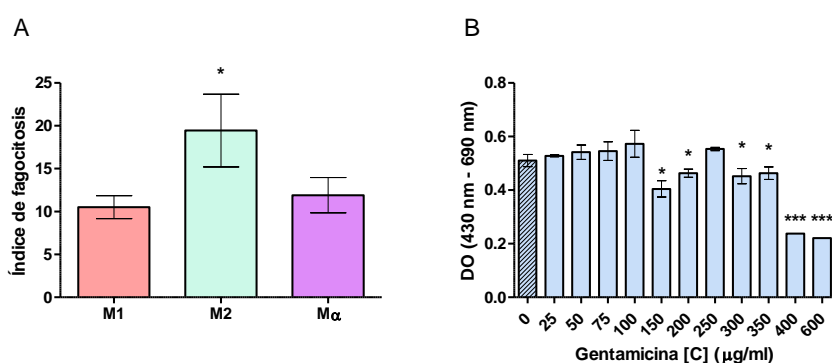


Figura 3.4. Índice de fagocitosis en Mφ-Mo perfilados. (A) Índice de fagocitosis definido como UFC (ml⁻¹) / número de células por pocillo. M1: Mφ-Mo perfilados con LPS, M2: Mφ-Mo perfilados con IL-4, Mα: Mφ-Mo perfilados con IFN-α por 24 horas. *: Diferencias significativas aplicando Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns. Resultados de 3 experimentos independientes. (B): Se estableció la toxicidad de gentamicina en cultivos primarios de Mφ-Mo bovinos tratándolos con concentraciones de 25 a 600 µg/ml. *: Diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05) y ***: (p < 0,001) aplicando el test ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni.

Se estableció además, la mayor concentración de gentamicina que no resultara tóxica en cultivos primarios de M ϕ -Mo bovinos; este valor fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$) (**Figura 3.4B**). Una vez puesta a punto la técnica se purificaron M ϕ -Mo, se los perfiló *ex vivo* y se realizó el ensayo de fagocitosis. El índice de fagocitosis se estableció como UFC (ml^{-1}) / número de células por pocillo. Se realizaron 3 experimentos independientes. Los M ϕ -Mo tratados con IL-4 presentaron una fagocitosis aumentada ($p < 0,05$), propia de este perfil funcional, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos. Los M ϕ M α y M1 presentaron valores similares de fagocitosis (**Figura 3.4A**).

3.3.2. Cinética de replicación del BVDV en un ciclo en macrófagos derivados de monocitos perfilados y producción de citoquinas inducidas por la infección

Para estudiar la interacción del BVDV con M ϕ -Mo de diferentes perfiles funcionales, se diferenciaron M ϕ -Mo provenientes de 3 animales, se estimularon con LPS (M1), IL-4 (M2) e IFN- α (M α) por 24 horas y se infectaron con el BVDV a una MOI = 2, o bien se le practicó infección simulada como control de infección.

Se cosecharon células y sobrenadantes a distintos tiempos post-infección, y se evaluó replicación viral intracelular por ELISA determinando la presencia de NS3 o producción de virus extracelular en los sobrenadantes de cultivo, por ensayo de microtitulación en placa. Los resultados se resumen en la **Figura 3.5A y 3.5B**.

Para los M ϕ M2 y M1 la cinética de replicación es similar a la observada en CMSP, con un pico de replicación a las 24 hpi, que se mantiene relativamente constante en el tiempo. Esto sucede tanto en la producción de partículas virales nuevas, como en la replicación intracelular. A las 24 hpi la producción de partículas virales en el medio extracelular, y la replicación intracelular son significativamente mayores en el fenotipo M2 respecto al fenotipo M1 ($p < 0,05$) (**Figura 3.5B**). El tratamiento con IFN- α previo a la infección, bloquea prácticamente por completo la replicación intracelular y la producción de partículas virales ($p < 0,05$).

En los cultivos infectados se evaluó la producción de citoquinas TNF- α e IL-10 a las 72 hpi (**Figura 3.5 C**) y la producción de IFN de tipo I y II (no se muestra).

La infección redujo la expresión de TNF- α respecto a las células no infectadas tanto en los M ϕ estimulados M1 como en los M α , mientras que casi no se verificaron cambios en los M ϕ estimulados con IL-4. En ningún caso las diferencias observadas resultaron estadísticamente significativas. En cuanto a la producción de IL-10 esta se indujo casi un 100 % más en el perfil M2 respecto al grupo control, y resultó significativamente superior a los niveles presentes en los perfiles M1 y M α ($p < 0,05$ en ambos casos). Los valores medios de IL-10 disminuyen

respecto del control en perfiles M1 y M α . Los valores de IFNs de tipo 1 y 3 se mantuvieron en valores casi indetectables en todos los perfiles en el tiempo evaluado (no se muestra), con valores por debajo de 0,09 UI/ml, tanto en M ϕ infectados como en los controles.

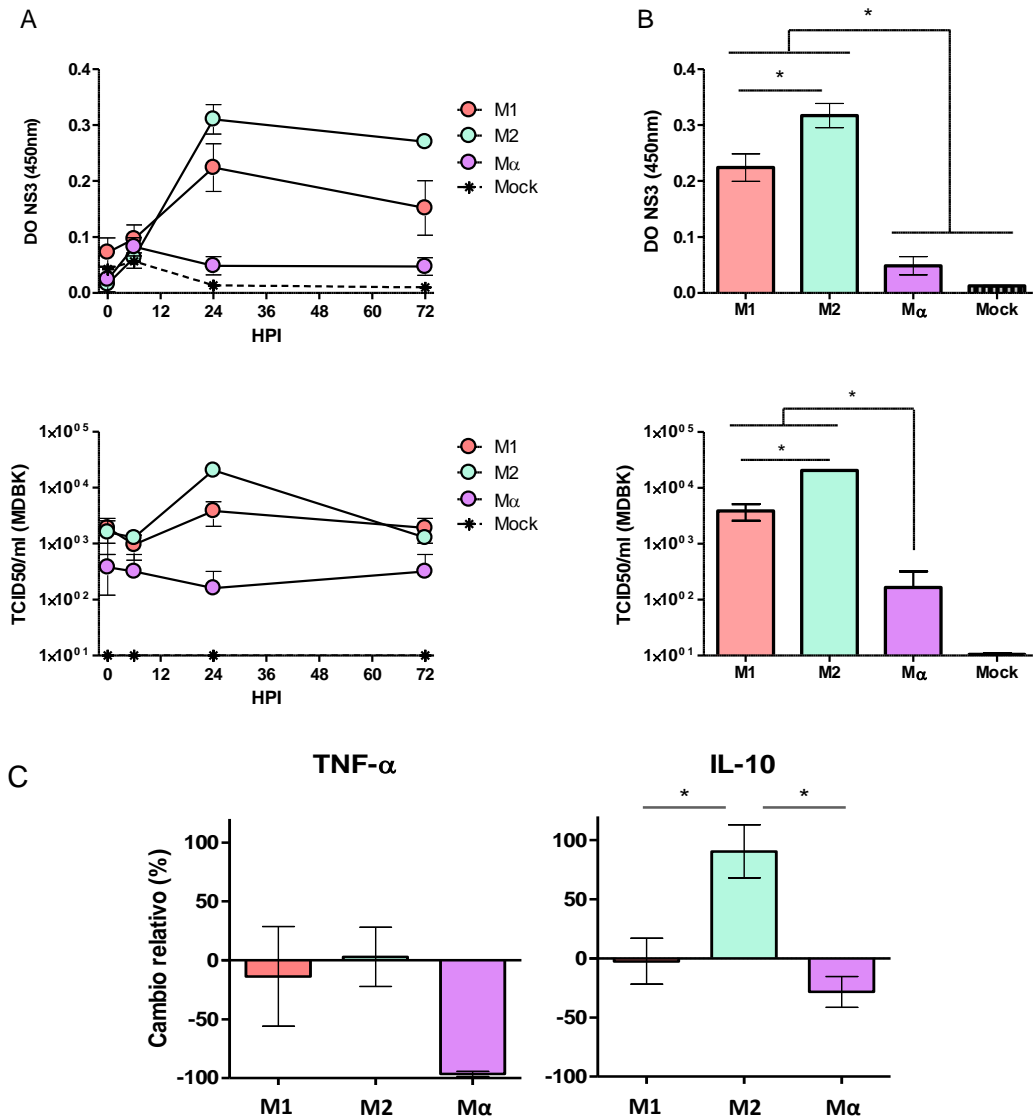


Figura 3.5. Cinética de replicación en un ciclo del BVDV en M ϕ -Mo perfilados y producción de citoquinas inducidas por la infección. Se obtuvieron M ϕ -Mo de 3 animales y se estimularon por 24 horas con LPS (M1), IL-4 (M2) e IFN- α (M α). Luego se infectaron con el BVDV a una MOI = 2 (o bien se practicó infección simulada para el control) y se cosecharon células y sobrenadantes a 0, 6, 24 y 72 hpi. (A) Cinética de replicación viral en un ciclo medida por producción de NS3 intracelular (arriba) o mediante titulación de los sobrenadantes (abajo) (B). Los graficos de barras se realizaron con los valores de replicación a las 24 hpi obtenidos por ELISA-NS3 (arriba) y titulación (abajo). (C) Producción de TNF- α (izq.) e IL-10 (der.) en los sobrenadantes de cultivo, medido por ELISA a las 72 hpi y expresado como cambio relativo en los niveles de citoquinas de las células infectadas respecto a las células con infección simulada. Resultados de 4 experimentos independientes. *: Diferencias significativas entre medias aplicando el test Kruskal-Wallis, seguido del test de Dunns.

3.3.3. Fagocitosis en macrófagos derivados de monocitos perfilados e infectados con el BVDV

Se analizó la capacidad fagocítica de M ϕ -Mo perfilados e infectados con el BVDV a una MOI = 2 o bien con infección simulada (**Figura 3.6**), utilizando la metodología descrita más arriba. La infección aumentó el valor medio del índice de fagocitosis para todos los tratamientos, y se pudo verificar que la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los M ϕ estimulados con IFN- α o LPS respecto de las mismas células sin infectar. El valor medio del índice de fagocitosis inducido por la infección en el perfil M2 fue superior respecto a las mismas células sin infectar, aunque las diferencias fueron marginalmente significativas ($p = 0,0511$).

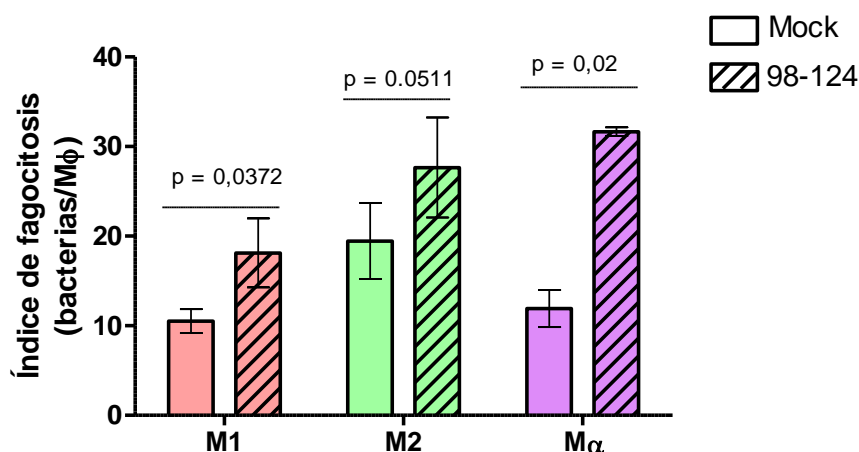


Figura 3.6. Actividad fagocítica en M ϕ -Mo perfilados e infectados con el BVDV. Los M ϕ -Mo se perfilaron por 24 horas con LPS (M1), IL-4 (M2) e IFN- α (M α). Luego se infectaron con el BVDV (MOI = 2) o se les practicó infección simulada. A las 24 hpi se realizó el ensayo de fagocitosis y se determinaron las UFC/ml de las bacterias fagocitadas. Resultados de 3 experimentos independientes. *: Diferencias significativas en comparaciones pareadas aplicando el test Mann-Whitney ($p < 0,05$).

3.3.4. Caracterización de marcadores de superficie en macrófagos derivados de monocitos perfilados e infectados con el BVDV

Con el objetivo de establecer cómo influye la infección con BVDV 98-124 en los marcadores de M ϕ -Mo perfilados con LPS, IL-4 e IFN- α e infectados *ex vivo* se evaluó por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD16, CD40, CD86, CD172a y MHC-II a las 72 hpi. Se realizaron 3 experimentos independientes con diferentes animales y se evaluó el porcentaje de células marcadas y el nivel de expresión de cada marcador mediante la IFM. Los resultados fueron altamente variables entre experimentos (no se muestra). Como se mencionó antes, la

expresión de marcadores resultaba variable en M ϕ -Mo sin infectar, y la infección pareció acentuar este fenómeno.

3.3.5. Actividad biológica y seguridad en el uso de azitromicina

La azitromicina es un antibiótico macrólido de amplio espectro reportado como inductor de un perfil de M ϕ -M2, tanto *in vitro* como *in vivo*^{170-172,174,182-184} con actividad bacteriostática y bactericida a altas concentraciones. Con el objetivo de incorporarlo a nuestros experimentos como una alternativa para polarizar M ϕ dentro del espectro M2, adquirimos la droga base comercial y evaluamos su actividad biológica como antibacteriano, antiviral y su efecto sobre la viabilidad de células de línea bovinas. Para constatar su actividad antibacteriana se hicieron crecer cultivos bacterianos de *E. coli* TOP10 en presencia de concentraciones crecientes de azitromicina en un rango de 8 a 5000 μ M, frente a un cultivo sin azitromina y un control sin antibiótico ni bacterias y se los incubó ON en agitación a 37 °C. A continuación se leyó la DO de la suspensión resultante, estableciéndose el grado de inhibición del crecimiento bacteriano. Se produjo una inhibición concentración dependiente con la concentración de 5000 μ M inhibiendo el crecimiento en valores superiores al 98 % y la inhibición en la concentración de azitromicina de 8 μ M fue superior al 72 % (**Figura 3.7A**).

También se verificó si la azitromicina afectaba la viabilidad de la línea celular bovina MDBK. Para ello se incubaron las células con concentraciones de azitromicina en un rango de 12,5 a los 6400 μ M por 72 horas. Se incluyeron controles de células sin azitromicina, a la cuales se les asignó un valor de crecimiento del 100 %, revelándose luego por tinción con cristal violeta. La concentración de 100 μ M resultó en una viabilidad de células superior al 90 %. La viabilidad no se vio afectada con concentraciones iguales o inferiores a 50 μ M (**Figura 3.7B**). En cuanto a la actividad antiviral, esta se evaluó también en células MDBK en un rango de 12,5 a 6400 μ M de azitromicina y las células fueron infectadas con la cepa cp Singer de BVDV e incubadas por 72 horas. Como antes, se incluyeron los controles de células sin azitromicina y controles virales de infección sin azitromicina. Como existió toxicidad por azitromicina en valores superiores o iguales a 100 μ M, solo se muestra la actividad antiviral en el rango de 12,5 a 50 μ M (**Figura 3.7C**). Teniendo en cuenta que la concentración de azitromicina que utilizamos luego para estimular M ϕ -Mo fue de 30 μ g/ml y que la concentración de 50 μ M equivale a 37,4 μ g/ml, podemos considerar que la azitromicina no es tóxica en esta concentración y que posee una actividad antiviral muy leve, con un valor inferior al 4 % y que por tanto no interfiere en los resultados.

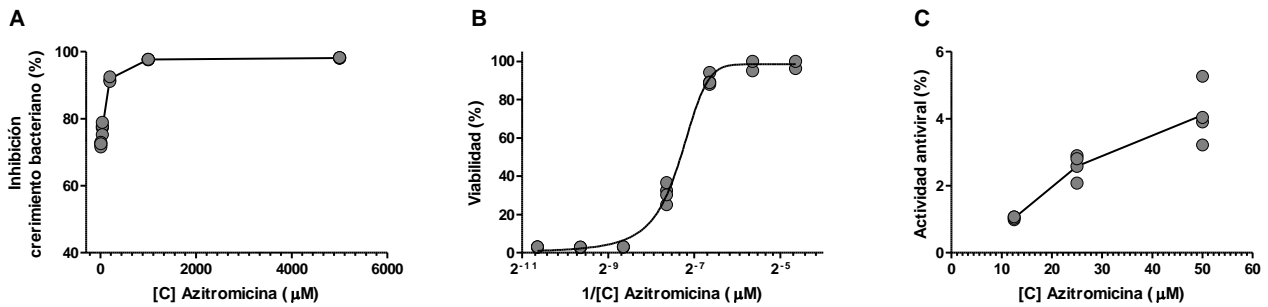


Figura 3.7. Actividad antibacteriana, antiviral y viabilidad de células MDBK frente a azitromicina. (A) Inhibición del crecimiento porcentual en cultivos bacterianos de *E. coli* TOP10 con distintas concentraciones de azitromicina (0 - 5000 μM). (B) Evaluación de toxicidad de azitromicina en células MDBK luego de 72 horas de exposición a diferentes concentraciones del antibiótico (12,5 - 6400 μM) y revelado por cristal violeta. Al control de células sin antibiótico se le asignó una viabilidad del 100 %. (C) Actividad antiviral de células MDBK creciendo con azitromicina por 72 horas en un rango de concentraciones de 12,5 a 6400 μM e infectadas con el BVDV (solo se muestra el rango de 12,5 a 50 μM que no presentó toxicidad). Ensayo revelado por cristal violeta. Resultados de 1 experimento con 4 réplicas cada uno.

3.3.6. Actividad arginasa, replicación y viabilidad en macrófagos derivados de monocitos adherentes perfilados e infectados con cepas del BVDV de diferente biotipo y genotipo

Como se mencionó en la introducción, la diversidad y complejidad de fenotipos de M ϕ posibles que pueden encontrarse en los tejidos, y en diferentes situaciones fisiopatológicas es muy vasta, y diversos trabajos reportan distintos marcadores como criterios de identificación de un tipo o subtipo particular de M ϕ . En este contexto, la actividad arginasa está propuesta como una firma inequívoca del espectro de perfiles M2 y puede utilizarse como criterio para diferenciarlo de los perfiles clásicos M1, frente a una multitud de marcadores que no siempre se comportan de manera clara^{105,106}.

Habiendo comprobado la relación entre actividad arginasa y mayor replicación en el perfil M2 provocada por la infección con el BVDV 98-124, diseñamos un experimento para determinar si esta relación es extensiva para otras cepas del BVDV de diferente genotipo y biotipo, y para otros estímulos clásicamente descritos como inductores del perfil M2 o M1. Para ello realizamos un experimento en M ϕ -Mo adherentes estimulados con inductores para el fenotipo M1, utilizando LPS (M-LPS) e IFN- γ (M-IFN- γ) o inductores típicos M2, utilizando IL-4 (M-IL-4) o azitromicina (M-Az) y se determinó la actividad arginasa. Se utilizaron las cepas cp 1a Singer, 1b 95409, 2a VS-253 y las cepas ncp 1b NY-1, 2b 98-124, 2 NY-93. El diseño del experimento y las determinaciones realizadas se esquematizan en la **Figura 3.8**.

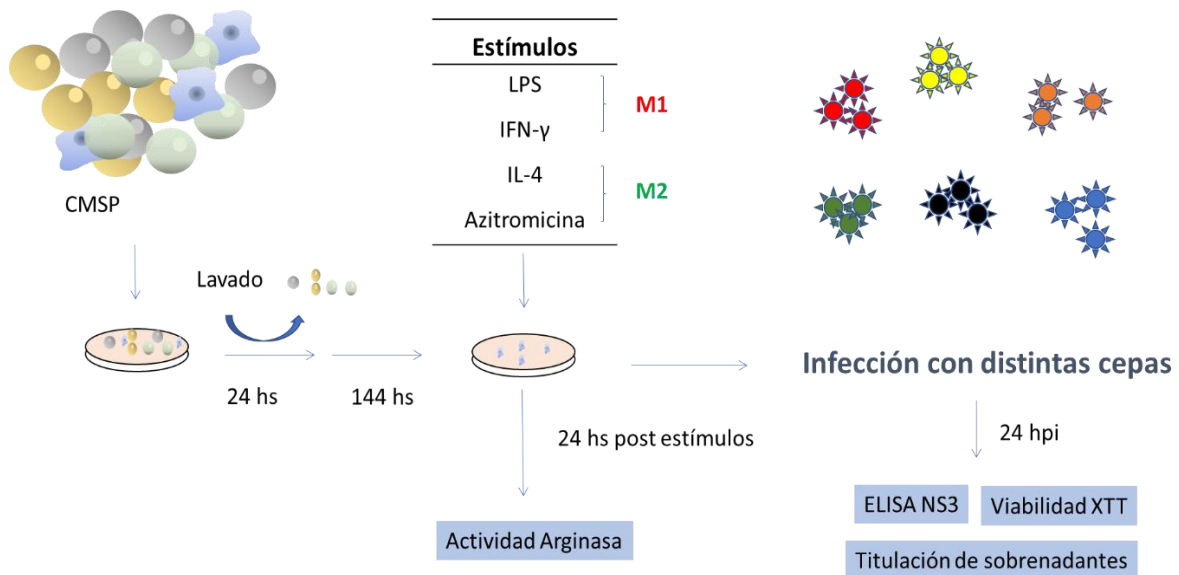


Figura 3.8. Flujo de trabajo seguido en el experimento de infectividad con diferentes cepas. Se purificaron CMSP provenientes de 4 animales y se los diferenció *ex vivo* a Mφ-Mo. Luego se los estimuló con LPS o IFN- γ para inducir un perfil M1 o bien con IL-4 o azitromicina, para inducir un perfil M2. 24 horas después se les determinó actividad arginasa o fueron infectadas con las cepas de BVDV cp 1a Singer, 1b 95409, 2a VS-253 o con las cepas ncp 1b NY-1, 2b 98-124, 2 NY-93, o bien se les practicó infección simulada. Los sobrenadantes de cultivo fueron titulados utilizando el ensayo de microtitulación en placa y en las células infectadas se determinó presencia de NS3 por ELISA y viabilidad por ensayo XTT.

3.3.6.1. Actividad arginasa

Los Mφ-Mo adherentes estimulados con LPS mostraron una actividad arginasa significativamente aumentada respecto al resto de los estímulos (**Figura 3.9**). Este resultado fue sorprendente dado que esperábamos una menor actividad arginasa para un estímulo descrito como inductor del perfil M1. Además este resultado se contrapone a los resultados anteriores donde M1 (estimulado con LPS) presentaba menor replicación de BVDV 98-124 y menor actividad arginasa, aunque en este caso los Mφ-Mo se purificaron por adherencia diferencial y no por el sistema MACS. Los estímulos inductores del perfil M2 (azitromicina e IL-4), presentaron valores medios mayores que IFN- γ , aunque no de manera significativa.

3.3.6.2. Viabilidad

Los cultivos de Mφ-Mo adherentes perfilados con LPS, IFN- γ , azitromicina e IL-4, fueron infectados con las cepas de BVDV antes mencionadas a una MOI = 2, o bien se les practicó infección simulada. Se determinó viabilidad celular mediante el ensayo XTT (**Figura 3.10**).

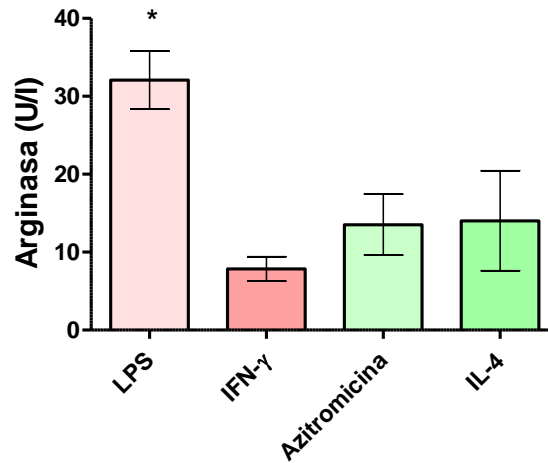


Figura 3.9. Actividad arginasa en Mφ-Mo adherentes perfilados. Se purificaron Mφ-Mo y se estimularon con LPS, IFN-γ, azitromicina e IL-4 por 24 horas, determinándose la actividad arginasa en células. Resultados de células purificadas de 4 animales distintos.

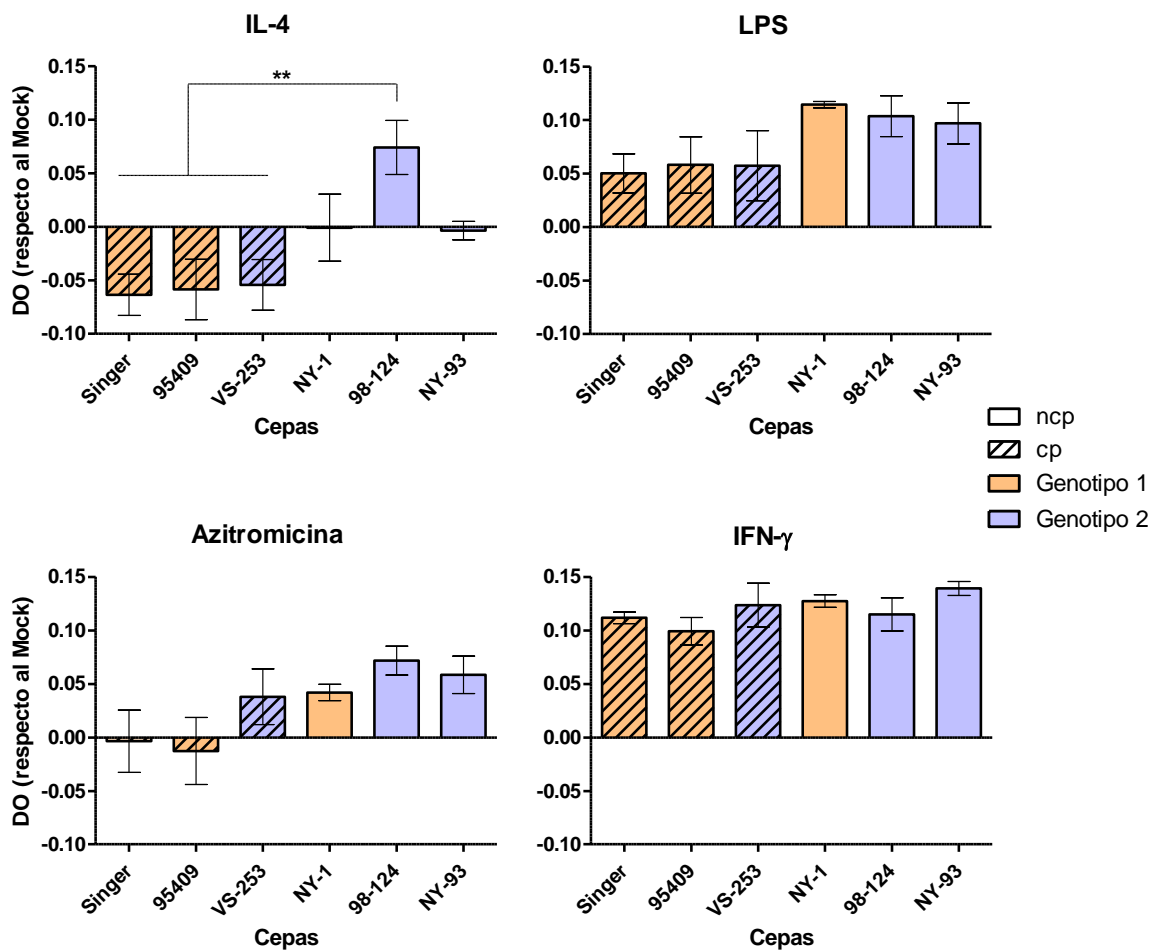


Figura 3.10. Tasa metabólica en Mφ-Mo perfilados e infectados con el BVDV de diferentes genotipos y biotipos. Se diferenciaron Mφ-Mo adherentes a partir de 4 bovinos y se estimularon con LPS, IFN-γ, IL-4 o azitromicina. Luego se les practicó infección simulada o bien se infectaron a una MOI = 2 con las cepas cp 1a Singer, 1b 95409, 2a VS-253 y las cepas ncp 1b NY-1, 2b 98-124, 2 NY-93. Se determinó luego la tasa metabólica porcentual respecto al Mock utilizando un ensayo colorimétrico (XTT). Resultados de células purificadas de 4 animales distintos. **: Diferencias significativas ($p < 0,01$) aplicando el test ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni.

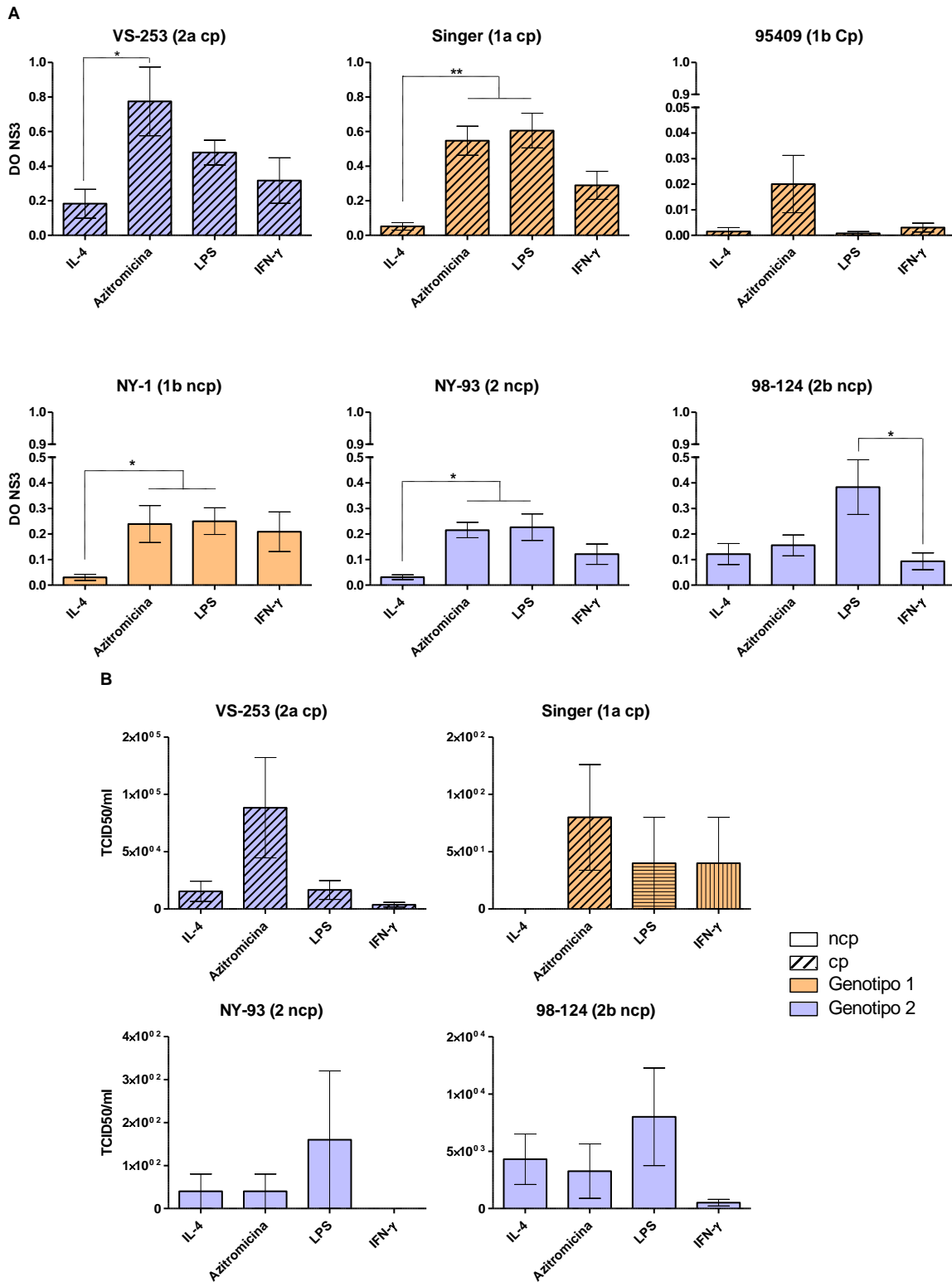


Fig. 3.11. Replicación viral en Mφ-Mo perfilados e infectados con el BVDV de diferentes genotipos y biotipos. Se diferenciaron Mφ-Mo adherentes a partir de 4 bovinos y se estimularon con LPS, IFN- γ , IL-4 y azitromicina. Luego se les practicó infección simulada, o bien se infectaron con las cepas del BVDV cp 1a Singer, 1b 95409, 2a VS-253 o las cepas ncp 1b NY-1, 2b 98-124, 2 NY-93. (A) Replicación intracelular determinada por ELISA anti-NS3 de genotipos 1 y 2 y de biotipos cp (panel superior) y ncp (panel inferior). (B) Titulación de virus infeccioso en sobrenadantes de genotipos 1 y 2 y de biotipos cp (panel superior) y ncp (panel inferior). No se detectó virus en sobrenadantes de las cepas 95409 y NY-1. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$). **: Diferencias significativas ($p < 0,01$) aplicando el test ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni en todos los casos.

La determinación de viabilidad XTT es un ensayo colorimétrico que utiliza sales de tetrazolio que son clivadas por deshidrogenasas de células metabólicamente activas, y la reacción va acompañada por aumento en la intensidad de color del reactivo. Por tanto, una DO baja en el ensayo puede explicarse por una caída en el metabolismo celular y/o por muerte celular.

La viabilidad de los M ϕ -Mo infectados se vio afectada de manera dependiente al estímulo recibido y al biotipo de la cepa infectante.

Los M ϕ -Mo tratados con IL-4 e infectados con las 3 cepas cp presentaron una muerte celular notable, lo cual se vio reflejado en una tasa metabólica marcadamente negativa respecto al Mock, y significativamente inferior a la presentada por los M ϕ -Mo infectados con 98-124 ($p < 0,01$). Por su parte, 98-124 presentó una tasa metabólica considerablemente mayor al Mock en estos M-IL-4. La tasa metabólica de las cepas ncp NY-1 y NY-93 prácticamente no se vio afectada por la infección.

Los M ϕ -Mo tratados con azitromicina, el otro inductor de perfil M2, también presentaron una tasa metabólica similar al Mock en valores medios en 2 de las 3 cepas cp. El resto de cepas presentan mayor tasa metabólica respecto al control sin infectar. En cuanto a LPS e IFN- γ aumentan en todos los casos la tasa metabólica respecto al Mock en M ϕ -Mo infectados con todas las cepas. En el caso de LPS, las 3 cepas cp presentan valores medios de DO menores respecto a las cepas ncp, aunque no de manera significativa, mientras que en los M-IFN- γ , la viabilidad de las células se ve aumentada de manera homogénea en todas las cepas estudiadas respecto al control sin infectar.

3.3.6.3. Replicación

La medición de la replicación viral se realizó a las 24 hpi, tiempo previamente establecido como el pico en la curva de replicación del BVDV en un ciclo. Se midieron los niveles de NS3 por ELISA, a partir de los lisados celulares, y se realizó la cuantificación del número de partículas infectivas en los sobrenadantes de cultivo mediante el ensayo de microtitulación en placa. La replicación mostró una tendencia similar para ambas determinaciones para todas las cepas independientemente del genotipo y biotipo. Los valores medios fueron superiores en M ϕ -Mo adherentes tratados con LPS y azitromicina tanto para NS3 como para producción de nuevas partículas virales extracelulares (**Figura 3.11**).

Considerando los niveles de NS3 intracelulares como medida de replicación viral, se observa que los valores son significativamente menores, en células tratadas con IL-4 respecto a las tratadas con azitromicina ($p < 0,05$ para VS-253, NY-1 y NY-93; $p < 0,01$ para Singer) o LPS ($p <$

0,05 para NY-93 y NY-1; $p < 0,01$ para Singer). Estos bajos niveles de replicación en los M-IL-4 infectados con cepas cp probablemente se debieron a la muerte celular inducida por este biotipo. Sin embargo, en las cepas ncp también los M-IL-4 presentaron una replicación baja, con excepción de aquellos infectados por la cepa 98-124. Justamente los M-IL-4 infectados con 98-124 presentaron una tasa metabólica aumentada respecto a las células sin infectar, por lo que no puede descartarse que estos dos fenómenos estén relacionados. La replicación intracelular de la cepa cp 95409 fue casi indetectable, teniendo valores apenas por encima del punto de corte establecido por el ensayo (**Figura 3.11A**). Es notable que 95409 a pesar de casi no haber replicado, causara muerte celular en los M-IL-4 como mencionamos en la sección 3.3.6.2. En ningún caso se observaron diferencias significativas en la replicación entre los M ϕ estimulados con IL-4 e IFN- γ , lo que hace suponer que estos M-IFN- γ probablemente controlaron mejor la replicación del virus. Respecto a 98-124, cepa de estudio de esta tesis, la replicación fue significativamente mayor en los M ϕ estimulados con LPS que en los M-IFN- γ ($p < 0,05$).

Los títulos virales a las 24 hpi fueron altamente variables entre cepas (los gráficos se presentan en distintas escalas). La cepa VS-253 presentó valores de título de entre 1 y 3 órdenes de magnitud mayor que las restantes cepas. No se detectó producción de virus en los sobrenadantes de cultivo por parte de las cepas 95409 y NY-1. En el caso de la cepa 95409, esta apenas registró replicación intracelular, pero es intrigante por qué no se detectó producción de virus en los sobrenadantes para NY-1 bajo ningún tratamiento, dado que esta cepa sí presentó replicación intracelular. Los estímulos azitromicina y LPS indujeron valores medios mayores en la producción de virus extracelular en las cepas cp y ncp respectivamente respecto de los M ϕ estimulados con IL-4 e IFN- γ , aunque no de forma significativa debido a una gran dispersión entre las muestras provenientes de diferentes donantes (**Figura 3.11B**). Nuevamente, los M-IFN- γ parecieron controlar mejor la replicación por cepas ncp respecto de los M ϕ estimulados con IL-4, azitromicina y LPS aunque las diferencias no fueron significativas. Los M-IL-4 casi no produjeron partículas virales nuevas en sobrenadantes cuando se infectaron por cepas cp, sin detectarse en la cepa Singer y presentando baja producción en VS-253. Recordemos que estos M ϕ M-IL-4 infectados por cepas cp morían, lo que seguramente afectó los resultados de replicación obtenidos.

3.3.6.4. Relación entre la actividad arginasa y la replicación viral

Observamos mayor replicación de los Mφ-Mo adherentes estimulados con LPS y azitromicina, tanto a nivel intracelular como en la producción extracelular de nuevas partículas virales. A su vez, se comprobó que los M-LPS presentaron mayor actividad arginasa al momento de la infección. Este resultado nos condujo a pensar que los M-LPS podrían estar comportándose como un perfil funcional del espectro M2, de manera opuesta a lo que encontramos en los experimentos anteriores.

Es posible pensar en un escenario donde los Mφ-Mo cultivados acarrean diferencias intrínsecas de origen, propias del status fisiológico (o fisiopatológico) del animal del cual fueron purificados. A fin de buscar una forma de “normalizar” dichas diferencias decidimos evaluar si la mayor actividad arginasa de un cultivo de Mφ guardaba relación con la tasa de replicación viral, independientemente de la cepa infectante y del tratamiento realizado a las células (**Figura 3.12**). Evaluamos entonces si existía asociación entre actividad arginasa y replicación mediante el test de Fisher.

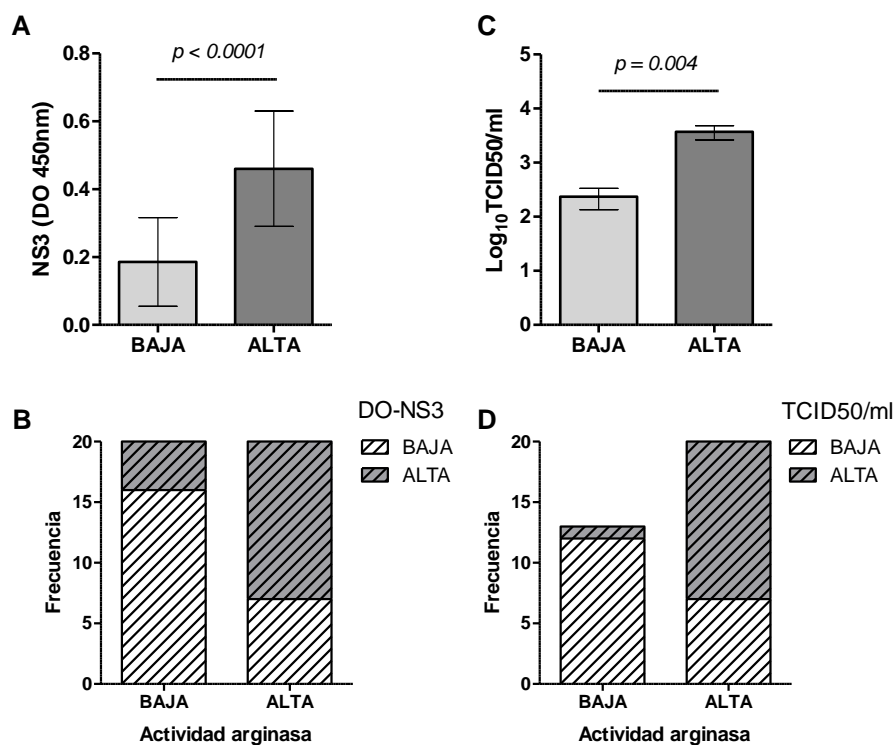


Figura 3.12. Test de Fisher de asociación entre actividad arginasa e infección por cepas de BVDV en Mφ-Mo perfilados. Asociación entre actividad arginasa y replicación viral intracelular (A) o producción de virus extracelular (C) en Mφ-Mo estimulados con LPS, IFN-γ, IL-4 o azitromicina e infectados con las cepas del BVDV cp 1a Singer, 1b 95409, 2a VS-253 y las cepas ncp 1b NY-1, 2b 98-124, 2 NY-93. Para establecer la relación se clasificó a los Mφ con actividad arginasa alta (≥ 15 U/l) o baja (< 15 U/l), y una replicación intracelular alta o baja ($DO \geq 0,3$ y $< 0,3$, respectivamente) en ELISA anti-NS3 (B), y valores de producción de virus extracelular altos o bajos (títulos $\geq 10^3$ y $< 10^3$ TCID₅₀/ml, respectivamente) (D). Las asociaciones se realizan en base a la frecuencia de Mφ-Mo en cada categoría de manera independiente a la cepa infectante y al estímulo que recibieron las células. Resultados de 4 experimentos independientes.

Para ello, clasificamos a los M ϕ en cuanto a su actividad arginasa, asignando arbitrariamente actividad alta o baja considerando valores ≥ 15 U/l y < 15 U/l respectivamente; y los relacionamos con valores de replicación intracelular altos o bajos (valores de $DO_{NS3} \geq 0,3$ y $< 0,3$, respectivamente) o con valores de producción de virus extracelular altos o bajos (valores de título $\geq 10^3$ y $< 10^3$ TCID50/ml, respectivamente) para realizar el test de asociación en base a las frecuencias encontradas.

El análisis demostró que existe una asociación positiva con alta significancia estadística entre actividad arginasa alta y replicación intracelular ($p < 0,0001$) (**Figura 3.12A y B**) y producción de virus extracelular ($p = 0,004$) (**Figura 3.12C y D**), siendo esta relación independiente del estímulo que recibieron las células y de la cepa viral infectante.

3.3.7. Actividad arginasa en macrófagos derivados de monocitos MACS o adherentes

En los resultados de experimentos anteriores comprobamos que los M ϕ -Mo estimulados con LPS podían comportarse como un fenotipo funcional M1 o M2 según fueran purificados por la tecnología MACS o por adherencia diferencial en placa, respectivamente. Si bien demostramos que los cultivos son equivalentes de acuerdo a la expresión de CD14, estos mostraban diferencias funcionales importantes en distintos experimentos. Hipotetizamos entonces que las diferentes técnicas de purificación podrían inducir perfiles funcionales distintos. Para contrastar esta hipótesis purificamos M ϕ -Mo provenientes de un único animal con el objetivo de reducir al mínimo posible las diferencias observadas y los purificamos simultáneamente por los dos sistemas. Luego de diferenciarse por 168 horas las células se cosecharon y se determinó la actividad arginasa, normalizándose a la concentración de proteínas presentes en la muestra.

Si se compara entre sistemas de purificación, la actividad arginasa tuvo un perfil similar, con mayor actividad arginasa en M-LPS seguido de M-IL-4 y luego por M-IFN- γ .

Dentro de los M ϕ -Mo purificados por adherencia en placa, la actividad arginasa de los M-LPS fue significativamente mayor que la de los M-IFN- γ y M-IL-4 ($p < 0,05$). Si comparamos entre ambos sistemas la actividad arginasa de los M ϕ M-LPS adherentes fue significativamente mayor que los M ϕ MACS M-IFN- γ y M-IL-4 ($p < 0,01$). Los resultados se muestran en la **Figura 3.13**. Considerando la actividad arginasa global producida por cada sistema de purificación, esta fue significativamente mayor en los M ϕ -Mo purificados por adherencia ($p < 0,05$) (no se muestra).

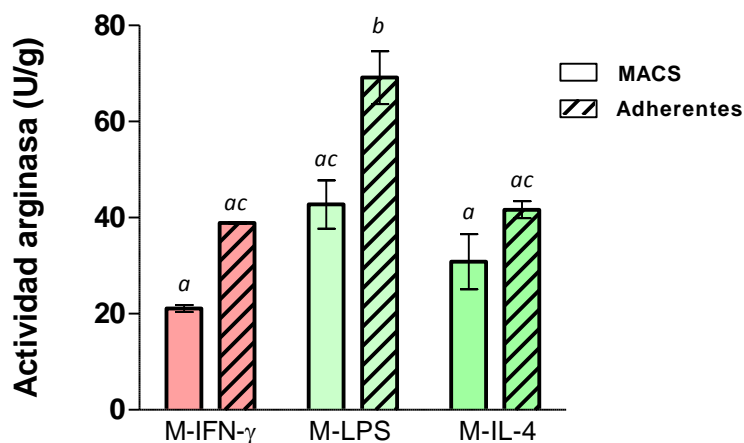


Figura 3.13. Actividad arginasa en M ϕ -Mo purificados por la tecnología MACS y por adherencia diferencial en placa. Se purificaron Mo provenientes de un animal por MACS o adherencia y se los dejó diferenciar a M ϕ -Mo por 168 horas. Luego se los perfiló por 24 horas con IFN- γ (M-IFN- γ), LPS (M-LPS) o IL-4 (M-IL-4) y se determinó la actividad arginasa la cual se normalizó a gramos de proteínas presentes en la muestra. Se muestran resultados de un único experimento, con 3 réplicas experimentales. La igualdad de al menos una letra señala igualdad estadística entre columnas. Diferencias significativas entre a y b ($p < 0,01$) y entre ac y b ($p < 0,05$) aplicando el test ANOVA de 2 vías seguido del test de Bonferroni.

3.3.8. Actividad arginasa y producción de óxido nítrico e IFNs de macrófagos derivados de monocitos provenientes de animales con distinto status fisiológico

Durante la preñez se ve favorecido un estado M2 en M ϕ útero-placentarios. En el período neonatal, los M ϕ presentan un perfil M2 relacionado con la ontogenia, expresan marcadores Th2 y son más vulnerables a infecciones intracelulares como las virales¹¹⁵. Habiendo establecido en nuestros M ϕ que la actividad arginasa es un buen indicador de un perfil de M ϕ -Mo antiinflamatorio y más permisivo a la infección con el BVDV, resultaba interesante explorar cómo es la actividad arginasa en M ϕ -Mo provenientes de animales con distinto status fisiológico.

Se diferenciaron M ϕ -Mo por adherencia diferencial provenientes de vacas adultas no preñadas ($n = 4$), vacas cursando el primer trimestre de preñez ($n = 4$) y terneros menores de 2 meses de edad ($n = 3$) y se determinó la actividad arginasa y la producción de NO *ex vivo*.

Los M ϕ -Mo provenientes de hembras preñadas y de terneros registraron una actividad arginasa significativamente mayor que aquellos provenientes de vacas adultas ($p < 0,05$) (**Figura 3.14**). Los valores medios de producción de NO fueron menores en vacas adultas, pero las diferencias no fueron significativas.

De estos M ϕ -Mo se determinó además la presencia de IFNs totales en sobrenadantes de cultivos. Se incluyó un control de M ϕ -Mo estimulados con el mitógeno Concavalina A (ConA) para asegurar que las células fueran capaces de inducir la producción de IFNs en caso de ser estimuladas.

Al igual que en otras determinaciones de IFNs en M ϕ -Mo de este trabajo, solo se detectó una producción basal muy baja (no se muestra), apenas por encima del límite de detección de la técnica. La producción de IFNs por parte de los M ϕ -Mo estimulados con ConA también fue baja, aunque significativamente mayor que la de los otros grupos ($p < 0,01$).

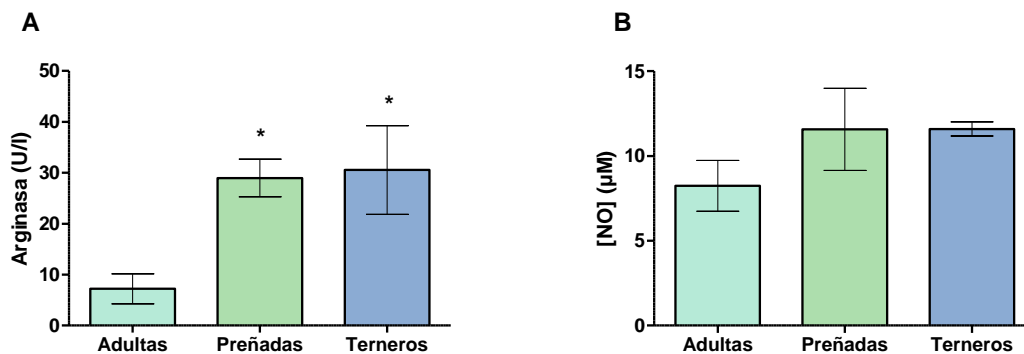


Figura 3.14. Actividad arginasa y producción de NO en M ϕ -Mo provenientes de animales con distinto status fisiológico. Se diferenciaron M ϕ -Mo provenientes de vacas adultas ($n = 4$), vacas cursando el primer trimestre de preñez ($n = 4$) y terneros menores de 2 meses de edad ($n = 3$) y se determinó la actividad arginasa (A) y la producción de NO (B). *: Diferencias significativas aplicando el test Anova de una vía, seguido del test de Bonferroni ($p < 0,05$).

3.3.9. Entrada del virus en macrófagos derivados de monocitos perfilados

Se había demostrado en el capítulo anterior que el BVDV utiliza la glicoproteína E2 para ingresar a los M ϕ -Mo. Se pasó a explorar la interacción de E2r con los M ϕ -Mo luego de los tratamientos con IL-4, azitromicina, LPS e INF- γ para verificar qué sucede con la adsorción de la proteína E2r en la superficie de los M ϕ -Mo adherentes (**Figura 3.15**).

Para ello realizamos tres experimentos en los que incubamos los M ϕ -Mo perfilados con diferentes concentraciones de E2r para luego infectarlos con el BVDV 98-124, o bien realizar una infección simulada. La infección se verificó por producción intracelular de NS3 a las 24 hpi. Los resultados muestran que los M ϕ -Mo con perfil M2, aquellos tratados con IL-4 y azitromicina, tuvieron valores medios de replicación mayores respecto de los M ϕ -Mo tratados con INF- γ y LPS, siendo la diferencia significativa ($p < 0,01$) entre los M-IL4 y los M-LPS. Los M-IL-

4 presentaron además valores de NS3 significativamente superiores a los de las células no infectadas ($p < 0,01$) (Figura 3.15F).

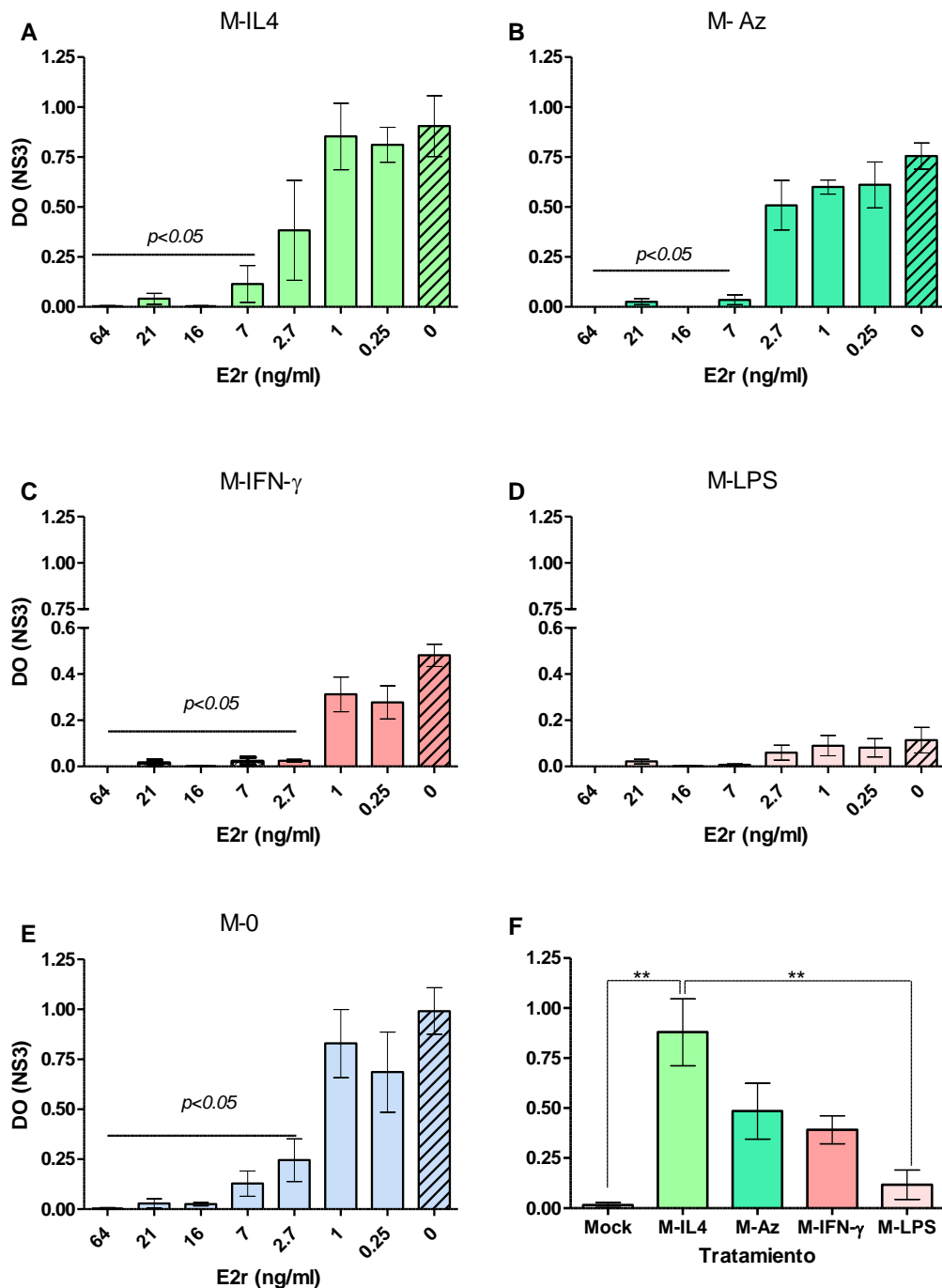


Figura 3.15. Inhibición de la infección por E2r en Mφ-Mo perfilados. Se perfilaron Mφ-Mo con (A) IL-4 (M-IL-4), (B) azitromicina (M-Az), (C) IFN-γ (M-IFN-γ), (D) LPS (M-LPS), o (E) medio de cultivo RPMIi (M0) por 24 horas, y se incubaron con E2r de 0,79 a 64 ng/ml, o bien con (F) RPMIi, durante 1 hora. Luego se las infectó con 98-124 MOI = 2 (o bien se les practicó infección simulada) y se determinó la replicación intracelular por ELISA NS3 a las 24 hpi. Para A a E, las diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron calculadas utilizando Kruskal Wallis seguido por el test de Dunns. En F, **: diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$) aplicando el test ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni.

La pre-incubación de los M ϕ -Mo con E2r redujo significativamente la infectividad viral en concentraciones mayores o iguales a 7 ng/ml para M-IL4 y M-Az ($p < 0,05$) (Figura 3.15A y B, respectivamente); y en concentraciones iguales o superiores a 2,7 ng/ml para M-IFN- γ y para los M ϕ -Mo sin perfilar ($p < 0,05$) (Figura 3.15C y E). Los M ϕ -Mo que habían sido diferenciados en presencia de LPS prácticamente no fueron infectados por el BVDV, mostrando una vez más la variabilidad asociada a este tratamiento en particular (Figura 3.15D).

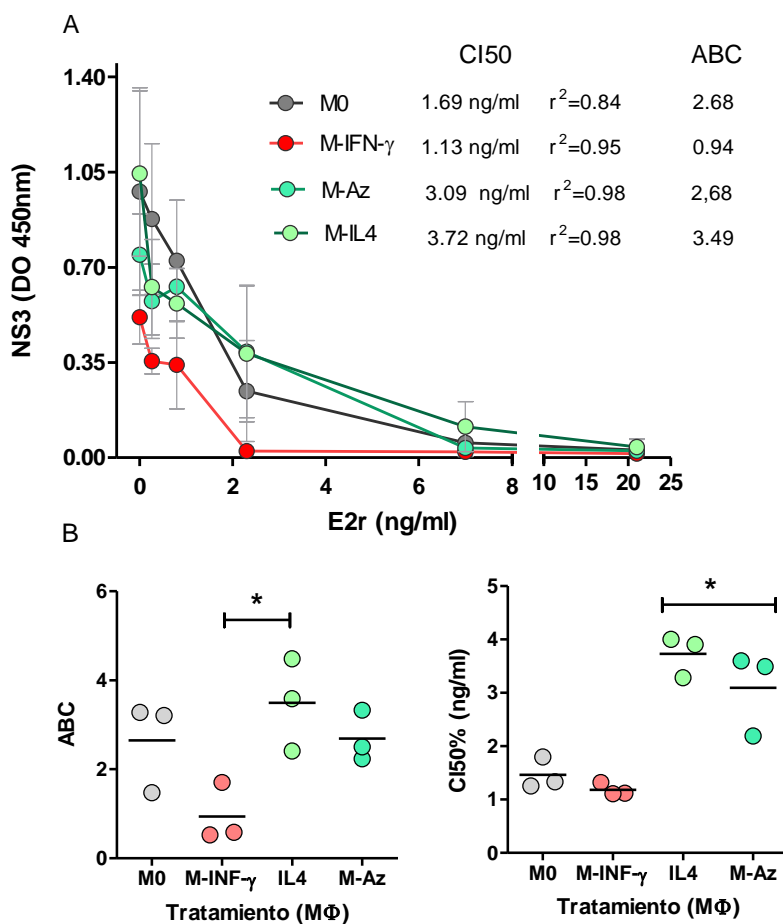


Figura 3.16. Curvas de inhibición de la infección por E2r en M ϕ -Mo perfilados. Se perfilaron M ϕ -Mo con azitromicina (M-Az), IL-4 (M-IL-4), IFN- γ (M-IFN- γ), LPS (M-LPS) o RPMli (M0) por 24 horas y se incubaron con E2r en un rango de 0,79 a 64 ng/ml o bien con RPMli. Luego se las infectó con 98-124 MOI = 2 (o bien se les practicó infección simulada) y se determinó la replicación intracelular por ELISA NS3 a las 24 hpi. (A) Curvas de inhibición de la infección para cada fenotipo de M ϕ -Mo. (B) Se muestra el ABC (izquierda) y las CI50 % (derecha) de cada curva (no se calculó para M-LPS, porque presentó muy poca replicación). *: Diferencias significativas aplicando ANOVA de una vía seguido de test de Dunns.

Una manera de comparar la inhibición ejercida por E2r entre los distintos fenotipos de M ϕ -Mo es comparar el área bajo la curva (ABC) y las CI50 %. Para ello se contruyeron curvas de

inhibición graficando las DO obtenidas para NS3 versus las concentraciones de E2r ensayadas tal como se realizó en el capítulo anterior. Las ABC de IL-4 es significativamente mayor que la de IFN- γ ($p < 0,05$), mientras que si se considera las CI50 %, los dos fenotipos M2 (azitromicina e IL-4), son significativamente mayores ($p < 0,05$ en ambos casos) que los fenotipos M-IFN- γ y M0 (**Figura 3.16**). Dados los bajos niveles de infección determinados en los M-LPS no fue posible calcular la CI50 % y ABC para este grupo.

A fin de verificar si existía una interacción cuantitativamente equivalente entre la proteína E2r y los diferentes perfiles de M ϕ -Mo, se construyeron las curvas de inhibición normalizando los niveles de infección porcentualmente respecto al control de cada fenotipo infectado pero no tratado con E2r, y asignándoles a estos últimos un valor de 100 %. De esta manera es posible comparar los valores de ABC independientemente de los niveles variables de infección que presenta el virus por las células que reciben diferentes tratamientos (**Figura 3.17**).

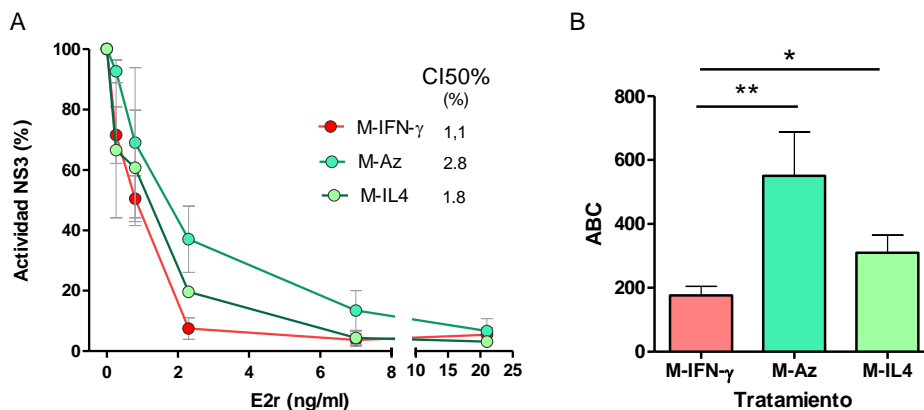


Figura 3.17. Curvas de inhibición normalizadas de la infección por E2r en M ϕ -Mo perfilados. Se perfilaron M ϕ -Mo con azitromicina (M-Az), IL-4 (M-IL-4), IFN- γ (M-IFN- γ), LPS (M-LPS) o RPMli (M0) por 24 horas y se incubaron con E2r en un rango de 0,79 a 64 ng/ml o bien con RPMli. Luego se las infectó con 98-124 MOI = 2 (o bien se les practicó infección simulada) y se determinó la replicación intracelular por ELISA NS3 a las 24 hpi. (A) Curvas de inhibición de la infección normalizadas para M-Az, M-IL-4 y M-IFN- γ respecto de cada fenotipo sin E2r, a los cuáles se les asignó un valor de 100 %. (B) Se muestran las ABC para cada fenotipo. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) y **: ($p < 0,01$) aplicando ANOVA de una vía seguido de test de Dunns.

Los resultados muestran que el ABC normalizada es significativamente mayor para el perfil M-Az respecto de los otros dos fenotipos ($p < 0,05$ frente a M-IL-4 y $p < 0,01$ frente a M-IFN- γ). A su vez el ABC de los M-IL-4 es significativamente mayor que la de los M-IFN- γ ($p < 0,05$).

Estos resultados indicarían que la infectividad diferencial de los M ϕ -Mo se debe, al menos en parte, a la distinta afinidad de E2 por cada fenotipo de M ϕ . Es decir que se necesita mayor cantidad de E2r para inhibir el pegado del virus a las células con perfil anti-inflamatorio (con altos niveles de actividad arginasa) que para aquellas con perfil proinflamatorio.

3.3.10. Conclusiones parciales

- Hemos caracterizado cultivos de M ϕ -Mo con diferentes tratamientos pudiendo identificarlos como M ϕ funcionalmente proinflamatorios o activados clásicamente “M1”, y antiinflamatorios o activados alternativamente “M2”.
- El BVDV infecta preferentemente un fenotipo funcional M2 de M ϕ induciendo la producción de IL-10.
- La infección induce un aumento de la fagocitosis en los perfiles de M ϕ -Mo estudiados.
- Observamos una asociación con alta significancia estadística entre actividad arginasa e infectividad por el BVDV. Esta relación es independiente del estímulo polarizador de los M ϕ -Mo y del biotipo y genotipo de la cepa infectante.
- Los M ϕ -Mo con perfil anti-inflamatorio (activados alternativamente) ofrecerían mayor disponibilidad de moléculas que mediarían la adsorción de la glicoproteína E2 sobre la membrana celular, la cual participa en el mecanismo de entrada del BVDV en este tipo de células.
- Demostramos diferencias en la actividad arginasa de M ϕ -Mo provenientes de bovinos de diferente status fisiológico y etario (hembras preñadas, hembras adultas y terneros).

Capítulo 4 - Estudios *in vivo*

Objetivos

4: Determinar si el comportamiento del virus en los diferentes fenotipos de M ϕ guarda relación con la inmunopatogenia observada *in vivo*.

Introducción

Habiendo estudiado la interacción del BVDV con M ϕ -Mo bovinos *ex vivo*, evaluamos si nuestras observaciones tenían un correlato con la infección y el desarrollo de la enfermedad *in vivo*. Previamente, nuestro grupo había caracterizado y establecido un modelo murino (BALB/c) de infección por el BVDV, particularmente con la cepa 98-124, con la que trabajamos en esta tesis¹⁷⁵. Este modelo fue desarrollado originalmente por Seong y col. en 2015¹⁸⁵ y adaptado a nuestra cepa de trabajo. En nuestro modelo se verifica viremia desde los 4-7 dpi que persiste en el tiempo, detectándose replicación en CMSP. Desde entonces se han publicado varios trabajos aplicando dicho modelo^{175,186-190}. Existen además reportes de la administración de azitromicina a ratones para obtener un perfil de tipo anti-inflamatorio a nivel de M ϕ , aplicando la misma a nivel sistémico^{170-172,182,183}.

En este capítulo diseñamos un experimento en el modelo murino y posteriormente en bovinos, a fin de establecer si un tratamiento a nivel sistémico es capaz de polarizar a los Mo y M ϕ *in vivo* y si este fenómeno afecta la capacidad del BVDV de infectar a estas células.

3.4. Resultados

3.4.1. Experimento en ratones

La hipótesis planteada fue que los ratones tratados con azitromicina presentarían mayor replicación viral y mayor actividad arginasa por desarrollar un perfil de M ϕ del fenotipo M2. El primer objetivo fue establecer un tiempo de respuesta óptimo en el que se verificara esta condición en M ϕ peritoneales, a fin de incluir más animales en un segundo experimento, que incluyera únicamente el tiempo elegido.

Utilizamos 30 ratones BALB/c (6 a 8 semanas de edad, peso 18 - 22 g) que fueron divididos en 2 grupos experimentales y distribuidos de manera homogénea en 6 jaulas distintas. Un grupo fue tratado con azitromicina IP (n = 18) y el otro recibió el diluyente por esta misma vía (grupo control, n = 12). A las 24 horas, dentro del grupo tratado con azitromicina, un subgrupo fue tratado con ABH IP (n = 4), un inhibidor específico de arginasa. Para estudiar el efecto de los tratamientos se separaron 3 animales del grupo azitromicina y 3 del grupo control. Se tomaron muestras de sangre y se eutanasiaron. Los animales restantes fueron infectados con el BVDV 98-124 por la vía IP y eutanasiados los días 1, 2, 4 y 7 post infección. De todos los animales se tomó la temperatura corporal y se verificó el estado general previo a la eutanasia. Inmediatamente después se purificaron M ϕ peritoneales que fueron incubados por 24 horas para determinar actividad arginasa y producción de NS3 intracelular. De la sangre obtenida se separó el suero para determinar viremia mediante ELISA en células. El diseño del experimento se esquematiza en la **Figura 4.1**.

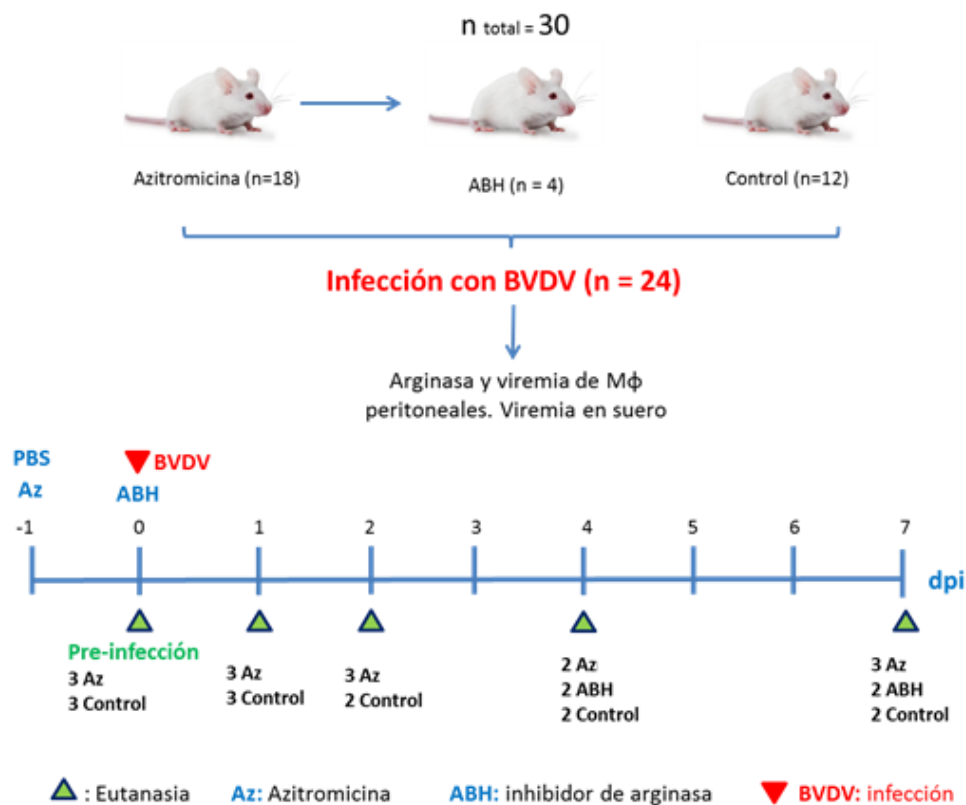


Figura 4.1. Diseño experimental de ensayo *in vivo* en el modelo murino. (A) Grupos experimentales: Azitromicina (n = 18) y Control (n=12). Dentro del grupo Azitromicina a las 24 horas se administró ABH (n = 4). Salvo 6 animales (3 de Azitromicina y 3 del Control), el resto se infectó con el BVDV 98-124. (B) Se muestra la cronología del experimento, los tratamientos aplicados y el número de animales eutanasiados en cada tiempo.

3.4.1.1. Resultados

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la **Figura 4.2**. Lamentablemente hubo que descartar del análisis a 6 animales que estaban infectados con parásitos protozoarios móviles presentes entre las células peritoneales, reduciendo considerablemente el n del experimento. Esta reducción en el tamaño grupal afectó al grupo control donde fue necesario desestimar 2 animales en el tiempo 1 dpi, al grupo ABH donde se desestimó a 1 animal en el tiempo 4 dpi y a 1 animal de cada grupo en el tiempo 7 dpi. La contaminación no pudo asociarse a una jaula en particular, y es posible que los animales ya estuvieran infectados al momento de adquirirse.

No se encontró signología clínica en los ratones infectados con el BVDV. La temperatura corporal se mantuvo dentro de parámetros normales a lo largo del experimento sin diferencias entre grupos experimentales. No se detectó replicación intracelular por presencia de NS3 en M ϕ peritoneales en ningún tiempo y en ningún grupo experimental. La viremia en suero es superior en el grupo control a los 7 dpi, no obstante no fue posible realizar estadística. La actividad arginasa en el grupo azitromicina presentó valores medios superiores a los 2 dpi y nuevamente a los 7 dpi respecto del control. Sin embargo, en este tiempo los valores son similares a los presentados por el inhibidor ABH, donde esperábamos que se produjera inhibición de la actividad arginasa y valores similares al grupo control.

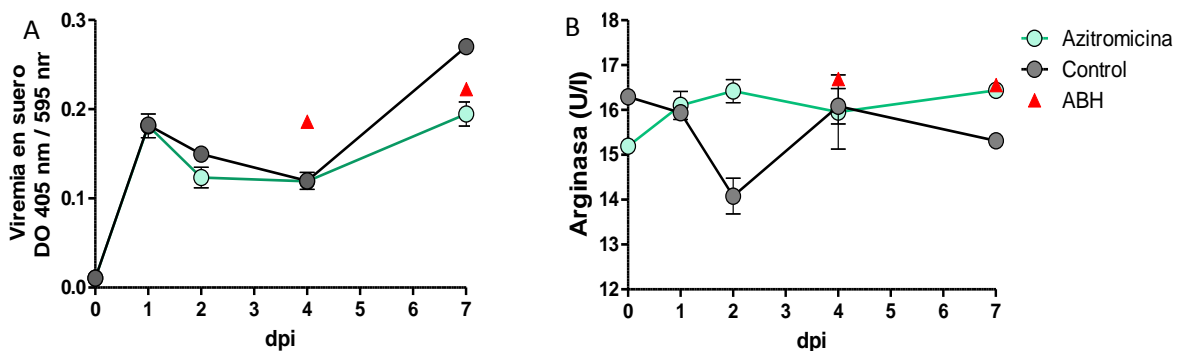


Figura 4.2. Viremia en suero y actividad arginasa en M ϕ peritoneales. Los ratones tratados con azitromicina, azitromicina + ABH y control fueron infectados con el BVDV 98-124 24 horas post tratamiento. Los tratamientos y la infección se realizaron por la vía IP. Los animales se eutanasiaron a los días 0 (pre-infección) y 1, 2, 4 y 7 dpi determinándose viremia en suero por ELISA en células (A) y actividad arginasa en M ϕ peritoneales (B). Para el grupo ABH las determinaciones se hicieron solamente en los tiempos 4 y 7 dpi.

3.4.2. Experimento en bovinos

El modelo ratón no resultó adecuado para verificar las hipótesis planteadas, por lo que se decidió trabajar directamente con el hospedador natural del BVDV, el bovino. El primer objetivo fue poner a punto un modelo de modificación del perfil funcional de los M ϕ . Si bien existen reportes de tratamientos que inducen un determinado perfil de los M ϕ en el modelo murino, en nuestro conocimiento no se han publicado reportes similares en bovinos. El experimento incluyó 9 terneros menores de 2 meses de edad, los cuales fueron separados en 3 grupos experimentales de 3 animales cada uno y nombrados según el tratamiento que recibieron: Azitromicina, Adyuvante oleoso y Control (no tratados). Los grupos experimentales, cronología del experimento y ensayos realizados se detallan en la **Figura 4.3**. La hipótesis planteada fue que, los terneros tratados con azitromicina presentarían mayor replicación en M ϕ -Mo *ex vivo*, con mayor actividad arginasa asociable a un perfil M2. El grupo Adyuvante fue incluido para promover un estado proinflamatorio propio de un perfil de M ϕ M1 en estos terneros.

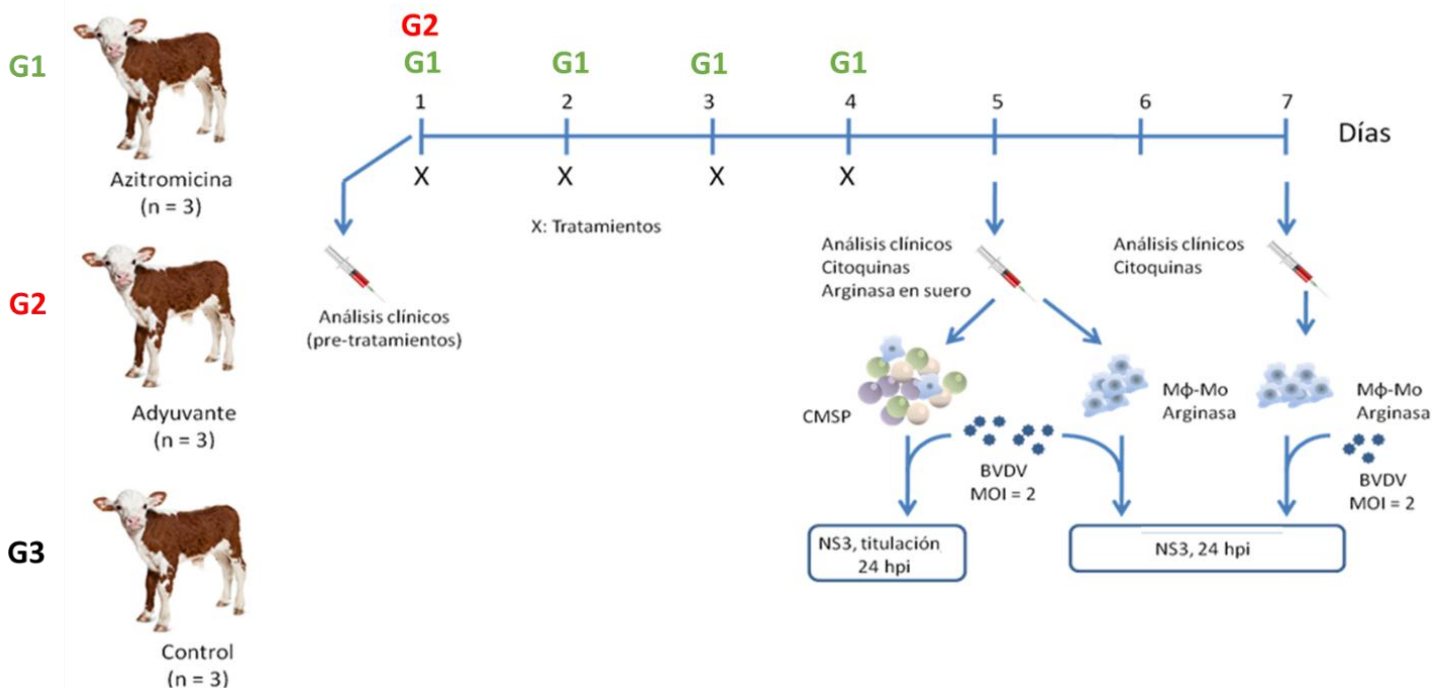


Figura 4.3. Diseño experimental del ensayo realizado en bovinos. Se muestran los grupos experimentales, Azitromicina (G1), Adyuvante (G2) y Control (G3) y la cronología del experimento. Los tratamientos se aplicaron por 4 días consecutivos para G1 y solamente el día 1 para G2. Se realizó un muestreo el día 1, previo al inicio de los tratamientos y luego los días 5 y 7. Se detallan los ensayos con células y las determinaciones realizadas.

Como se señaló en la metodología, para el grupo Azitromicina el diseño experimental original contemplaba la administración por la vía IV de 10 mg/Kg por cuatro días consecutivos, según se estableció en una tesis doctoral de la UNLP como único antecedente¹⁷⁶. El primer día de administración del tratamiento, uno de los animales presentó aturdimiento y desorientación tras la aplicación. Los síntomas remitieron en pocos segundos, y no se requirió intervención veterinaria. Por motivos de bienestar animal, se decidió pasar entonces a un esquema oral de 1 g por día; de modo que los animales de este grupo recibieron una primera dosis de 10 mg/Kg IV y 3 dosis diarias orales consecutivas de 1 g. Los animales del grupo Adyuvante oleoso recibieron 2 ml de adyuvante IM en la tabla del cuello el día 1 del experimento y el grupo control permaneció sin recibir tratamiento. Se tomaron muestras de sangre y suero de todos los animales el día de inicio del experimento, antes de la aplicación de los tratamientos, y los días 5 y 7 posteriores. Los días 1, 5 y 7 se realizaron sobre estas muestras análisis clínicos de rutina. Además los días 5 y 7 se determinaron citoquinas en suero (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10) y se determinó actividad arginasa en suero a los 5 días de iniciado el experimento.

Para establecer si los M ϕ -Mo presentaban algún tipo de cambio en su perfil, los días 5 y 7 se purificaron M ϕ -Mo a partir de sangre periférica y se determinó la actividad arginasa. Un set de réplicas fue infectada *ex vivo* con el BVDV 98-124 a una MOI = 2, o bien se les practicó infección simulada. De estas células se determinó replicación intracelular por presencia de NS3 a las 24 hpi. El día 5 post-tratamiento también se purificaron CMSP y se infectaron ese mismo día con una MOI de 2, o bien se les practicó infección simulada. A las 24 hpi se determinó NS3 y producción de virus infeccioso en sobrenadantes por la técnica de microtitulación en placa.

3.4.2.1. Seguridad de los tratamientos aplicados

El hemograma de los animales no mostró diferencias significativas inducidas por los tratamientos en ningún tiempo. La proteína C reactiva (PrCR), indicador de inflamación aguda, fue significativamente mayor en el grupo Azitromicina el día 5 ($p < 0,05$), respecto a los grupos Control y Adyuvante. Sin embargo, en el día 1 previo al inicio de los tratamientos, 2 de los animales del grupo Azitromicina tenían este indicador aumentado ($0,70 \pm 0,04$ mg/dl), y si excluimos el valor proveniente del ternero con el valor bajo de PrCR, esta se encuentra significativamente aumentada ($p < 0,05$) en este grupo previo al inicio del experimento. Según la bibliografía consultada no hay registros de valores de referencia de PrCR en bovinos. En un trabajo publicado que incluía 29 bovinos sanos, los valores de PrCR fueron de $0,489 \pm 0,04$

mg/dl¹⁹¹. Si tomamos este valor como referencia, no se puede descartar que estos 2 terneros presentaran un proceso inflamatorio agudo antes de iniciarse el experimento.

Los valores de eritrosedimentación, colesterol y hepatograma no arrojaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los tiempos analizados, con excepción de la bilirrubinemia total que al día 7 de iniciado el experimento fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los animales tratados con Azitromicina y Adyuvante respecto al grupo Control. A diferencia de lo que sucede con la PrCR, no puede asociarse el valor elevado con un animal en particular, sino a que todos los animales, tanto controles como tratados, comenzaron con valores medios elevados ($0,7 \pm 0,00$ mg/dl). Estos valores, luego fueron normalizándose únicamente en el grupo Control hasta valores medios de $0,47 \pm 0,06$ mg/dl (valores de referencia: hasta $0,47$ mg/dl)¹⁹². Los resultados de los análisis clínicos se muestran en la **Tabla 3.2.**

3.4.2.2. *Actividad arginasa, expresión de citoquinas y replicación viral en células inmunes*

Considerando la actividad arginasa en suero, no se observaron diferencias significativas entre grupos. El valor medio más alto correspondió al grupo Adyuvante, aunque con considerable desviación entre terneros. Se detectó IFN- γ sérico en todos los grupos experimentales en los distintos tiempos con valores promedio prácticamente idénticos a los del grupo Control, excepto en el día 5, cuando los valores medios en los grupos Azitromicina y Adyuvante fueron superiores a los del grupo Control aunque estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas (**Figura 4.4**). No se encontraron niveles séricos detectables de IL-1 β , IL-10 y TNF- α en ningún grupo experimental y en ninguno de los tiempos ensayados.

Los grupos Control y el tratado con Adyuvante mostraron bajos niveles de replicación viral en CMSP purificadas el día 5 post-tratamiento. La proteína NS3 fue casi indetectable en el grupo Adyuvante y no se detectó en el grupo Control. Ambos grupos presentaron bajos niveles de producción de partículas virales, cuantificadas mediante microtitulación a partir de los sobrenadantes. Se detectó mayor replicación viral en el grupo Azitromicina. En este grupo, las CMSP de todos los animales tuvieron producción de NS3 intracelular y altos títulos virales en los sobrenadantes, aunque las diferencias no fueron significativas debido a la dispersión de los datos, como suele obtenerse en animales exocriados, y con el número limitado analizado (**Figura 4.5**).

Eritrosedimentación, PrCR, colesterol y hepatograma

RESULTADOS

Grupo	Animal	Día	ERI (mm)	PrCR (mg/dl)	COL (mg%)	BD (mg%)	BT (mg%)	TGO (UI/l)	TGP (UI/l)	FAL (UI/l)	PRO (g%)
Azitromicina	513	1	1	0,40	131	0,2	0,7	64	15	354	6,1
		5	1	0,42	137	0,2	0,5	58	13	296	6,1
		7	1	0,29	124	0,2	0,6	54	13	304	6,2
	517	1	1	0,73	151	0,2	0,7	66	13	380	5,9
		5	1	0,82	142	0,2	0,5	54	10	305	5,8
		7	1	0,10	100	0,2	0,7	53	10	332	5,9
	518	1	1	0,67	108	0,2	0,7	47	11	439	6,4
		5	1	0,84	124	0,2	0,6	45	8	411	6,6
		7	1	0,15	79	0,2	0,6	42	10	431	6,8
Adyuvante oleoso	504	1	1	0,50	152	0,2	0,7	63	10	315	5,9
		5	1	0,41	131	0,2	0,7	62	10	317	5,6
		7	1	0,05	78	0,2	0,7	55	11	321	5,8
	505	1	1	0,28	108	0,2	0,7	66	15	187	5,7
		5	1	0,08	60	0,2	0,6	53	11	118	5,5
		7	1	0,23	88	0,2	0,6	49	11	148	5,8
	508	1	1	0,51	130	0,2	0,7	56	12	389	6,2
		5	1	0,22	94	0,2	0,7	60	12	287	6,3
		7	1	0,04	53	0,2	0,7	45	10	299	6,4
Control	506	1	1	0,40	107	0,2	0,7	66	22	101	6,3
		5	1	0,28	102	0,1	0,5	80	21	91	6,1
		7	1	0,04	65	0,1	0,5	60	17	90	6,2
	509	1	1	0,27	93	0,2	0,7	58	12	314	5,9
		5	1	0,13	77	0,2	0,6	55	10	259	5,7
		7	1	0,04	52	0,2	0,5	49	9	245	6,0
	514	1	1	0,29	112	0,2	0,7	54	13	178	5,6
		5	1	0,12	106	0,2	0,7	70	14	174	5,5
		7	1	0,03	54	0,1	0,4	47	12	148	5,5

Hemograma

Grupo	Animal	Día	Hematías (/mm ³)	Hto (%)	Hb (g/100 ml)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	RDW-C.V. (%)
Azitromicina	513	1	8500000	36,0	11,9	42,35	14,00	33,06	26,2
		5	8390000	34,9	11,7	41,60	13,95	33,52	26,0
		7	8940000	37,2	12,5	41,61	13,98	33,60	26,3
	517	1	7960000	34,6	11,1	43,47	13,94	32,08	23,6
		5	7460000	31,9	10,5	42,76	14,08	32,92	23,0
		7	8380000	35,5	11,9	42,36	14,20	33,52	24,2
	518	1	7280000	30,9	11,1	42,45	15,25	35,92	28,2
		5	7740000	32,8	11,9	42,38	15,37	36,28	28,2
		7	7840000	33,0	12,1	42,09	15,43	36,67	28,3

RESULTADOS

		1	7510000	30,4	11,5	40,48	15,31	37,83	28,6
	504	5	7000000	27,8	10,6	39,71	15,14	38,13	26,9
		7	6930000	27,2	10,7	39,25	15,44	39,34	27,1
Adyuvante oleoso	505	1	7600000	32,6	11,0	42,89	14,47	33,74	26,2
		5	7290000	30,3	10,8	41,56	14,81	35,64	26,0
		7	7510000	31,0	11,1	41,28	14,78	35,81	26,4
508	1	8630000	35,1	12,0	40,67	13,90	34,19	26,6	
	5	8980000	36,3	12,8	40,42	14,25	35,26	26,7	
	7	8740000	34,6	13,0	39,59	14,87	37,57	26,9	
506	1	7410000	27,9	11,2	37,65	15,11	40,14	24,9	
	5	7400000	27,8	11,4	37,57	15,41	41,01	25,1	
	7	7300000	27,2	11,5	37,26	15,75	42,28	25,2	
Control	509	1	6570000	25,0	10,0	38,05	15,22	40,00	26,5
		5	6740000	25,7	10,3	38,13	15,28	40,08	26,2
		7	6680000	25,2	10,7	37,72	16,02	42,46	26,1
514	1	7530000	32,4	10,9	43,03	14,48	33,64	28,5	
	5	7590000	31,8	11,2	41,90	14,76	35,22	28,7	
	7	7700000	31,9	11,4	41,43	14,81	35,74	29,0	

Células blancas sanguíneas

Grupo	Animal	Días	Leucocitos (/mm ³)	Neutr. en Cayado (%)	Neutr. Segm. (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)	Monocitos (%)	Linfocitos (%)
Azitromicina	513	1	9100	0	28	0	1	13	58
		5	12000	0	23	0	1	19	57
		7	8500	0	16	0	1	17	66
	517	1	9600	0	23	0	0	9	68
		5	9200	0	20	0	1	9	70
		7	9500	0	23	0	1	7	69
	518	1	9800	0	25	0	1	14	60
		5	14500	0	35	0	1	12	52
		7	11100	0	28	0	1	13	58
Adyuvante oleoso	504	1	11000	0	18	0	1	17	64
		5	9100	0	16	0	1	14	69
		7	9700	0	18	0	1	8	73
	505	1	13800	0	17	0	1	16	66
		5	14000	0	14	0	1	14	71
		7	13100	0	24	0	1	13	62
	508	1	7000	0	19	0	1	14	66
		5	7400	0	13	0	1	13	73
		7	7600	0	17	0	1	13	69

		1	12600	0	30	0	1	7	62
	506	5	9800	0	18	0	1	9	72
		7	11000	0	18	0	1	8	73
Control	509	1	11600	0	22	0	1	10	67
		5	8900	0	9	0	1	11	79
		7	10100	0	17	0	1	16	66
	514	1	6200	0	18	0	1	11	70
		5	6200	0	20	0	1	10	69
		7	7500	0	22	0	2	12	64

Tabla 3.2. Análisis clínicos del experimento en bovinos. Se muestran valores correspondientes a los días 1, 5 y 7 de eritrosedimentación (ERI), proteína C reactiva (PrCR), colesterol (COL), bilirrubinemia directa (BD), bilirrubinemia total (BT), transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvico (TGP), fosfatasa alcalina (FAL), proteínas séricas (PRO), hematíes, hematocrito (Hto), hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (VCM), Hb corpuscular media (HCM), concentración de Hb corpuscular media (CHCM), amplitud de distribución eritrocitaria (RDW-C.V.), leucocitos, neutrófilos en cayado (NC), neutrófilos segmentados (NSe), eosinófilos, basófilos, Mo y linfocitos.

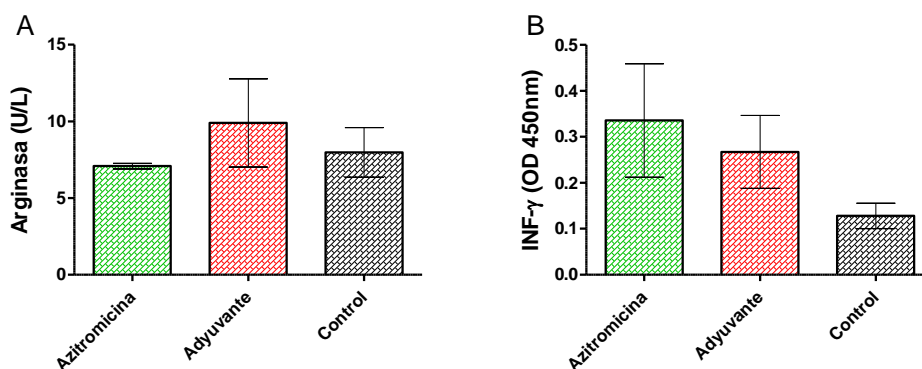


Figura 4.4. Actividad arginasa e IFN- γ en suero. Determinación de actividad arginasa (A) y producción de IFN- γ (B) en suero el día 5 post-tratamiento.

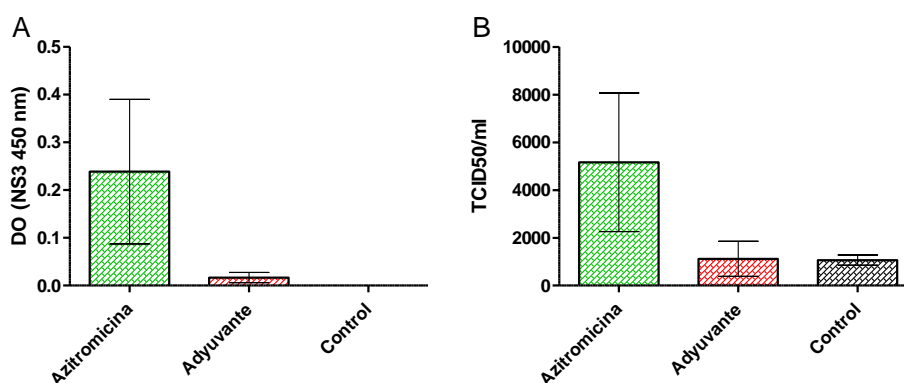


Figura 4.5. Replicación en CMSP día 5. Replicación intracelular por ELISA NS3 (A) y por producción de partículas infecciosas en sobrenadantes mediante ensayo de microtitulación en placa (B) a las 24 hpi. Cultivos infectados *ex vivo* con una MOI = 2 con 98-124. Valores expresados como diferencias respecto al Mock.

Considerando la actividad arginasa en M ϕ -Mo purificados los días 5 y 7 de iniciado el experimento, no existen diferencias significativas entre grupos cuando comparamos actividad dentro de un mismo día, para ninguno de los dos días estudiados (**Figura 4.6.A**). La actividad arginasa es significativamente mayor ($p < 0,001$) en los M ϕ -Mo purificados el día 7 que la de aquellos purificados el día 5 (**Figura 4.7**). El día 5 se observa una tendencia hacia valores medios más bajos de la actividad arginasa en el grupo Azitromicina respecto de los otros dos grupos de M ϕ -Mo, y esta relación se invierte el día 7.

La replicación en M ϕ -Mo obtenidos los días 5 y 7 tampoco presentó diferencias significativas entre grupos experimentales ya que se observó una desviación considerable entre individuos dentro de cada grupo, sin embargo, al día 5, se observó una tendencia hacia valores medios bajos en el grupo Azitromicina respecto a los otros grupos experimentales, y esta relación se nuevamente se invirtió el día 7 (**Figura 4.6.B**). Como se observó en experimentos anteriores, es llamativa la similitud entre los gráficos de replicación y los de actividad arginasa (aunque existe considerable dispersión).

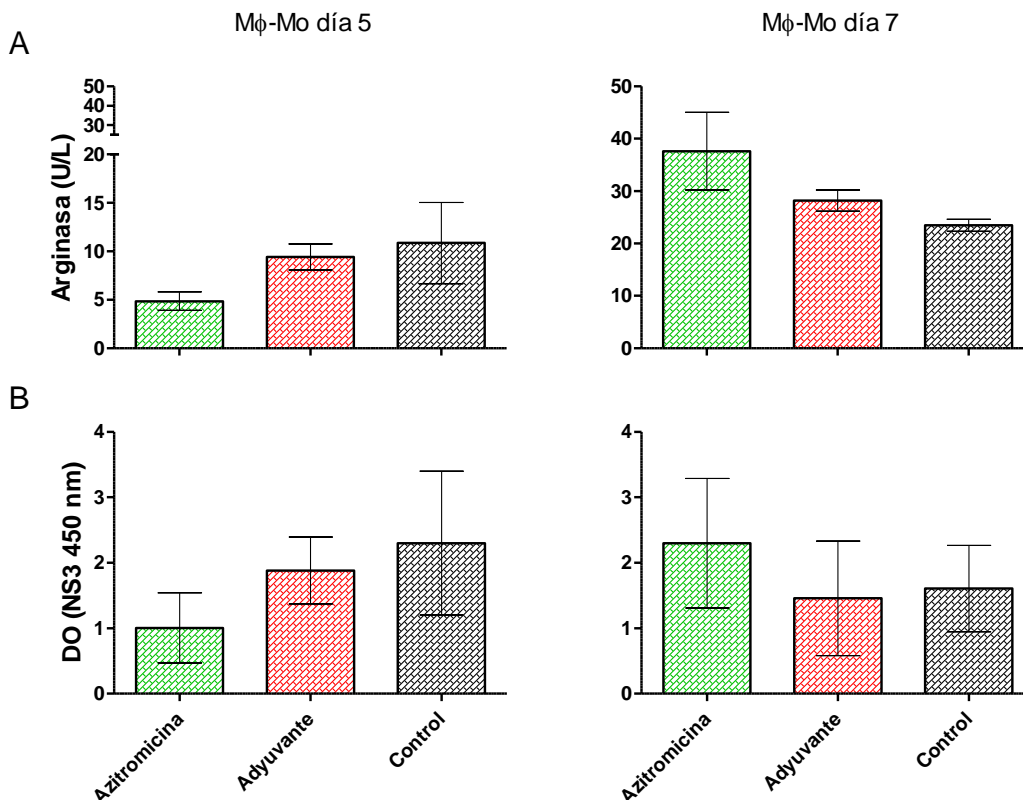


Figura 4.6. Replicación intracelular y actividad arginasa en M ϕ -Mo purificados los días 5 y 7. Los Mo obtenidos de los distintos animales fueron cultivados por 8 días para obtener M ϕ -Mo y luego se determinó actividad arginasa (arriba). Un set de réplicas fue infectada con el BVDV a una MOI = 2 (o bien se les practicó infección simulada). A las 24 hpi se determinó replicación intracelular por ELISA NS3 (abajo). Los valores se expresan como diferencias respecto al Mock.

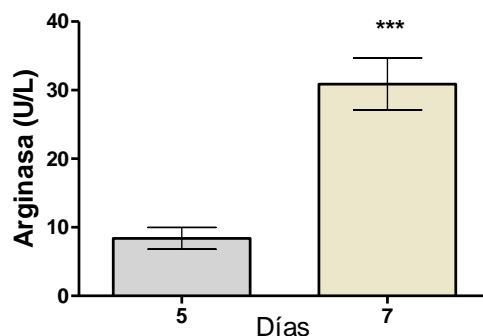


Figura 4.7. Actividad arginasa global en M ϕ -Mo purificados los días 5 y 7. Los Mo obtenidos de los distintos animales fueron cultivados por 8 días para obtener M ϕ -Mo y luego se les determinó actividad arginasa.

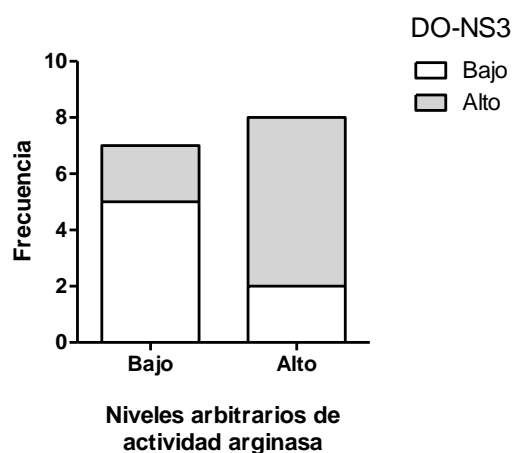


Figura 4.8. Test de Fisher de asociación entre actividad arginasa e infección por BVDV en M ϕ -Mo purificados de los grupos Azitromicina, Adyuvante y Control. Asociación entre actividad arginasa y replicación viral intracelular en M ϕ -Mo de los 3 grupos experimentales. Para establecer la relación se clasificó a los M ϕ -Mo con actividad arginasa alta (≥ 10 U/l) o baja (< 10 U/l), y con replicación intracelular alta o baja, con DO ≥ 1 y < 1 , respectivamente en ELISA anti-NS3. Las asociaciones se realizan en base a la frecuencia de M ϕ -Mo en cada categoría.

Con el fin de estudiar si existe relación entre la actividad arginasa de los M ϕ -Mo y la infectividad del BVDV, realizamos un análisis de contingencia considerando la actividad arginasa y los valores de NS3, independientemente del tratamiento realizado sobre los animales de los cuales se purificaron las células y considerando los datos de ambos días post-tratamiento.

El número limitado de datos no permite realizar el análisis de contingencia entre las proporciones de frecuencias con un 95 % de confianza (se requiere un mínimo de 5 datos en cada categoría). No obstante, si se realiza el análisis con una confianza del 85 % se verifica una asociación significativa entre la infectividad y la actividad arginasa de los M ϕ -Mo.

Aún con la alta dispersión y el bajo número de datos, se observa la asociación antes descrita *in vitro*, siendo la infectividad de los M ϕ -Mo mayor cuanto mayor sea la actividad arginasa de estas células, incluso cuando el estímulo que induce el fenotipo particular de los M ϕ se aplica directamente al animal, o sea, *in vivo* (**Figura 4.7**). Si bien asociación no es causa, es una observación que hemos podido comprobar tanto *ex vivo* como *in vivo*. Igualmente es necesario realizar un estudio más grande con un número mayor de animales para poder confirmar dicha asociación estadísticamente, con un 95 % de confianza.

3.4.3. Conclusiones parciales

- El modelo murino no resultó de utilidad para estudiar interacciones con M ϕ peritoneales, dado que no detectamos replicación del BVDV 98-124 en estas células.
- En el modelo bovino, la replicación de BVDV en CMSP sería mayor tanto a nivel intracelular como en producción de virus infectivo en los animales tratados con azitromicina.
- La azitromicina aplicada a terneros por vía sistémica induce mayor producción de arginasa en M ϕ -Mo el día 7 post inicio del tratamiento, aunque las diferencias no fueron significativas.
- Las tendencias observadas en la producción de NS3 y la actividad arginasa de los M ϕ confirmarían la asociación entre estas variables *in vivo*.

4. DISCUSIÓN

El BVDV es un patógeno viral que causa inmunosupresión en los animales infectados. El BVDV provoca depleción de linfocitos (T y B) y Mo^{89,193,194} y afecta la actividad de las CD⁸¹ generando inmunosupresión. Los Mo y los Mφ residentes en tejidos son células esenciales de la respuesta inmune innata a los patógenos.

Se ha demostrado que BVDV disminuye la proliferación de linfocitos¹²⁰, la quimiotaxis en Mo¹⁹⁵, la actividad microbicida de los neutrófilos¹⁹⁶, la actividad quimiotáctica de los neutrófilos dependiendo del biotipo¹⁹⁷ y la expresión del complemento, los receptores Fc y la producción de quimioquinas de los Mφ alveolares¹⁹⁶ que, en conjunto, sugiere una amplia modulación inmunitaria dentro de un huésped infectado. Se ha sugerido que los Mo y Mφ son fundamentales en la infección por BVDV para diseminar el virus^{150,198} e iniciar la apoptosis de las células T durante la infección¹⁹⁹. Se observa linfopenia severa en animales infectados, sin embargo, el número de Mφ no se reduce en la periferia²⁰⁰. Esta observación sugiere que los Mφ pueden desempeñar un papel fundamental en la recuperación de la infección por BVDV, ya que no se agotan durante el curso de la infección. Todo esto apoya la relevancia del estudio de la interacción entre el BVDV y los Mφ bovinos.

El presente trabajo demostró, utilizando Mφ-Mo bovinos en cultivos primarios, que la infección por el BVDV es mayor en Mφ alternativamente activados (M2) polarizados tanto *ex vivo* como *in vivo*, y que la mayor infectividad está asociada a la actividad arginasa de los Mφ-Mo. Los datos sugieren un rol de E2 en la entrada del virus a los Mφ. Hemos caracterizado la polarización de los Mφ-Mo del huésped en diferentes etapas de la vida y la asociación con la infección, lo que puede sentar las bases para futuras investigaciones sobre el mecanismo de escape inmunitario y la inmunopatogenia del BVDV.

4.1. Capítulo 1 - Interacción del BVDV con células inmunes bovinas

La elección de la cepa de trabajo se basó en que había sido ampliamente caracterizada *in silico*, *in vitro* e *in vivo* por nuestro grupo²². BVDV 98-124 es una cepa de baja virulencia y circulación local, elegida además prospectivamente en caso de precisar realizar ensayos a campo sin poner en riesgo la vida de los animales. Recientemente nuestro grupo ha publicado un estudio

de IFN como antiviral en el modelo murino utilizando esta misma cepa¹⁷⁵ y una infección experimental en bovinos a campo²⁰¹.

El BVDV ingresa al organismo principalmente por la vía respiratoria, se disemina por el epitelio orofaríngeo y replica activamente en las amígdalas palatinas. Luego el virus pasa al torrente sanguíneo donde se encuentra de forma libre e infectando intracelularmente distintas poblaciones de CMSP⁴², detectándose incluso hasta 98 días después de producirse la infección aguda¹. De hecho la detección en muestras de suero del animal infectado, constituye un método de diagnóstico de rutina^{1,42}. La cepa 98-124 fue capaz de sostener una replicación en CMSP *ex vivo* hasta el último tiempo analizado de 144 hpi (**Figura 1.1**). En el caso de NY-93, este experimentó una notable pérdida de virulencia, debido probablemente a su amplificación en laboratorio en células de línea, dado que estos resultados se oponen a hallazgos anteriores de nuestro grupo, donde NY-93 presentaba mayor replicación en estas células, respecto a 98-124²².

En cuanto a la expresión génica de citoquinas inducidas por la infección, observamos regulación negativa para TNF- α , IL-10, IFN- α , IFN- γ e IL-6 en CMSP infectadas con ambas cepas respecto al control con infección simulada. De este modo el BVDV estaría interfiriendo con la expresión de citoquinas, lo que podría entorpecer una respuesta eficiente *in vivo*. A pesar de que NY-93 presentó menor replicación fue capaz de regular negativamente la transcripción de IFN- λ , mientras que 98-124 lo hace positivamente. No obstante, no siempre existe una correlación entre lo que se observa a nivel de la expresión génica y las proteínas secretadas, probablemente debido a regulaciones aguas abajo de la transcripción. Existen reportes de estas discrepancias en M ϕ -Mo infectados con el BVDV^{79,139}. Dado que estos estudios en la expresión corresponden a las 24 hpi estudiamos la secreción de IFNs y citoquinas a distintos tiempos post infección y solamente detectamos producción de IFN de tipo I, II y III en CMSP; a partir de las 24 hpi para IFN-I y III y a partir de las 48 hpi para IFN- γ (**Figura 1.2**). El virus inactivado no provoca producción de IFN- γ , por lo que probablemente sea necesaria la presencia de virus replicativo para desencadenar una respuesta potente. Esto es relevante en el contexto de las estrategias de vacunas atenuadas.

Nuestro grupo y otros investigadores han reportado depleción masiva de linfocitos producida por el BVDV *in vivo*^{22,52,89,149}. La depleción se produce a nivel de tejido linfoide y se acompaña por un aumento considerable en el número de M ϕ en médula y corteza de órganos linfoides. No obstante no se ha establecido una relación causal clara entre M ϕ y depleción de linfocitos, y es posible que se encuentren realizando funciones de limpieza de linfocitos apoptóticos¹⁴⁹. Chase y col. detectaron un factor soluble producido por M ϕ -Mo que induce apoptosis en linfocitos¹⁴⁴, pero no fueron capaces de determinar la naturaleza de este factor.

Las CMSP infectadas fueron capaces de producir IFNs de tipo I, II y III, por lo que resultaba relevante establecer si estos IFNs circulantes podrían causar apoptosis en linfocitos, dado que los 3 tipos de IFNs presentan actividad pro-apoptótica²⁰²⁻²⁰⁴. Los IFN-I y -III aplicados exógenamente en las condiciones del ensayo, no indujeron muerte celular en las CMSP, como así tampoco la combinación del tratamiento con IFNs y la posterior infección con el BVDV (**Figura 1.3**). Restaría evaluar si el IFN- γ puede causar apoptosis en estas células. Por otro lado, el IFN- α pareció ejercer un efecto antiviral parcial disminuyendo la replicación intracelular, no obstante, estas diferencias no fueron significativas. Curiosamente, la viabilidad de células tratadas con IFN- α fue ligeramente superior en valores medios a la presente en las CMSP no tratadas y tratadas con IFN- λ , no obstante, estas diferencias tampoco fueron significativas. Cuando se añadió la infección a los pre-tratamientos con IFNs la viabilidad se mostró similar entre tratamientos.

Habiendo observado replicación sostenida de nuestra cepa de estudio en CMSP *ex vivo*, era relevante establecer el tropismo del BVDV en estas células inmunes. En un primer experimento encontramos, mediante un análisis de citometría de flujo, una mayor proporción de eventos BVDV positivos en la población, definida por tamaño y granulosidad, correspondiente al linaje monocítico (**Figura 1.5**). Esta tendencia fue confirmada en un experimento posterior orientado a distinguir tropismo sobre poblaciones celulares. Los marcadores utilizados fueron CD21, CD4, CD8 y CD172a (**Figura 1.6**). TCD4 y TCD8 son los receptores de células T de los correspondientes linajes CD4 y CD8. En CMSP bovinas, CD21 se encuentra restringido a células B²⁰⁵ y CD172a se expresa en la línea mieloide y es adecuado para marcar la población monocítica bovina^{116,206}, estando presente en los 3 tipos de Mo bovinos descritos²⁰⁷ y siendo negativo en linfocitos bovinos²⁰⁸. Encontramos un claro tropismo del BVDV por este linaje monocítico, verificado porque i) existe mayor porcentaje de células infectadas en el linaje, ii) son el linaje menos numeroso dentro de las CMSP y iii) porque al disminuir la MOI 10 veces, la disminución en la infección del linaje cae en menor proporción en este linaje respecto de los otros estudiados. Esto convierte al BVDV en un virus eminentemente monocitotrópico.

En este contexto, podría cobrar relevancia la hipótesis de “Caballo de Troya” común a los virus monocitotrópicos, donde estos secuestran precursores monocíticos, promueven la diferenciación a M ϕ -Mo y CD derivadas de Mo (CD-Mo) de larga vida y se infiltran en todos los tejidos y/o en órganos linfoides, promoviendo la diseminación viral⁹⁴. Esta hipótesis es compatible con la depleción de linfocitos en linfonódulos característica de la infección por BVDV *in vivo*^{78,89,146}.

Hasta el momento existen solo dos publicaciones donde estudiaron el tropismo del BVDV en CMSP. El primero data de 1994 donde se determinó el tropismo, partiendo de muestras de

sangre de ganado virémico infectado con la cepa Pe515 1a y con otras cepas no identificadas. En ese trabajo se utilizó el anticuerpo IL-A24 (anti-células mieloides) para la detección de Mo y un anti CD21 para células B. Los autores reportaron 23 % de las CMSP positivas para BVDV, siendo la población de Mo la que más se infectaba (35 %). En segundo lugar se infectaban células TCD2 (células T y NK) con un 23 % de células infectadas, frente a 11 % de células B¹⁹⁴. El otro estudio fue realizado por Falkenberg y col., quienes utilizaron terneros PI infectados con BVDV 1b y 2a. Los autores trabajaron con sondas de ARN específicas para regiones codificantes de N^{pro} y E^{rns} y marcadores de antígenos de superficie para poblaciones celulares. Constataron que a medida que avanzaba la severidad de la enfermedad, se verificaba una progresión en la infección desde las poblaciones de células TCD4 y TCD8 donde el virus era casi indetectable, hacia células CD14+ y células B en donde aumentaba considerablemente el porcentaje de infección. Las CMSP totales infectadas aumentaron ligeramente durante el transcurso del experimento, y drásticamente en el período crítico de la enfermedad (previo a la eutanasia). Los autores sugieren que la ausencia de virus en células T estaría relacionada con una caída en la inmunotolerancia a la cepa infectante²⁰⁹.

Nuestros resultados *ex vivo* son consistentes con estos 2 trabajos *in vivo* que presentan entre ellos nada menos que 25 años de diferencia en el año de publicación. Además, es la primera vez que se utiliza la cepa 98-124 (genotipo 2b) en un ensayo de esta naturaleza. Estos antecedentes son importantes porque validan nuestro modelo de infección *ex vivo* con el BVDV en CMSP.

4.2. Capítulo 2 - Interacción del BVDV con los macrófagos bovinos

En el capítulo 1 se estableció que la cepa argentina 98-124 (genotipo 2b, biotipo ncp) posee un comportamiento eminentemente monocitotrópico. En este contexto se comenzó a estudiar la interacción del virus con Mφ-Mo. Las dos técnicas existentes para purificar Mo bovinos^{116,117,159,160,125-131,158}, y que se utilizaron en este trabajo, dieron por resultado cultivos equivalentes para el marcador CD14 (**Figura 2.1**). Esto permitió la realización de experimentos que involucraban mayor número de animales y tratamientos.

En cultivos de Mφ-Mo la cinética de replicación viral de un ciclo fue similar a la observada en CMSP, con un pico de replicación a las 24 hpi. La cinética es similar cuando se examina tanto NS3 intracelular como producción de virus infeccioso en los sobrenadantes de cultivo por titulación (**Figura 2.2**). Al igual que con CMSP, esto motivó a que en experimentos posteriores se escogiera el tiempo de 24 hpi para las determinaciones de replicación.

Para poder evaluar si la infección de los M ϕ estaba mediada por la glicoproteína E2 de la envoltura viral, se produjo esta proteína en forma recombinante utilizando el sistema de baculovirus – células de insecto¹⁶⁸. En este caso se acopló a un sistema que permite la biotinylación durante la producción de la proteína¹⁶⁷. Se comprobó que dicha proteína tenía actividad biológica con capacidad de inhibir la replicación del BVDV tanto en células de línea MDBK (**Figura 2.3**) como en cultivos primarios de M ϕ -Mo sin mostrar toxicidad en ninguno de los dos sistemas. Lamentablemente la proteína no mostró señales de estar biotinylada, por lo que no fue posible detectarla directamente con los ensayos disponibles para tal fin. Previamente nuestro grupo había estudiado la entrada del BVDV en CD-Mo utilizando ensayos de competencia, comprobando que el BVDV infectaba estas células utilizando E2⁸¹. En M ϕ -Mo E2 también media la entrada del virus a la célula y su efecto es dosis dependiente, siendo capaz de inhibir casi por completo la infección a concentraciones de 16 ng/ml (**Figura 2.4**).

A fin de comprobar la especificidad de la interacción de E2 con los M ϕ -Mo utilizamos un anticuerpo monoclonal anti-E2¹⁶⁸. Este anticuerpo neutralizante²¹⁰ que fue incubado con el virus previo a la infección, causó reducción de la infección de hasta casi un 80 % en una dilución de 1/200.

El anticuerpo monoclonal utilizado en los experimentos aquí presentados está dirigido hacia una proteína E2 codificada por una cepa de genotipo 1¹⁶⁸ y nuestra cepa de trabajo 98-124 es de genotipo 2. En el BVDV tipo 1, E2 presenta un único epítipo neutralizante y en el BVDV tipo 2, E2 presenta 3 epítipos⁵². Sabemos que este anticuerpo tiene reacción cruzada neutralizante con 98-124²¹⁰, no obstante reconoce un solo epítipo de E2 lo que podría explicar que aun utilizando altas concentraciones del anticuerpo monoclonal, no se logró un bloqueo completo de la infección.

Los receptores implicados en la entrada del BVDV en las células huésped permanecen elusivos. Como se describió en la introducción, se sabe que CD46 es un receptor para BVDV que interactúa con E2 en la unión inicial del virus a la célula^{31,32}. No obstante la expresión de CD46 en células no susceptibles que soportan la replicación del ARN viral no las hacen permisivas a la infección³⁴. Además CD46 se encuentra excluido de la vesícula endosomal³² por lo que es probable que exista/n otro/s co-receptores implicados. Se ha propuesto al receptor de LDL como candidato a co-receptor del BVDV, pero distintos reportes han llegado a conclusiones encontradas respecto al papel de este receptor^{34,35}. En el Virus del Dengue DC-SIGN participa en la unión inicial célula-virus y es encontrado en vesículas endosomales. Sin embargo, células mutantes incapaces de internalizar DC-SIGN continúan siendo permisivas a la infección¹⁷⁹. En el caso de otro Flavivirus como el HCV, el tratamiento con Manann no inhibe la infección viral²¹¹.

En nuestros experimentos hubo una reducción no significativa de la infección con Mannan pero no hubo una inhibición concentración-dependiente. Esto podría explicarse porque la concentración de 1 mg podría ser saturante, y/o que la inhibición no fuese del todo específica. La incubación de los M ϕ -Mo con un anticuerpo policlonal anti-DC-SIGN mostró reducción significativa de la infección solo a concentraciones altas de anticuerpo, a partir de la dilución 1/20. Nuestros resultados con inhibiciones parciales de la entrada del virus indicarían que el BVDV podría quedar adsorbido en la superficie de M ϕ de modo inespecífico, por la unión de E2 a lectinas de la superficie de estas células, y que esto favorecería su posterior internalización.

El ingreso de ciertos virus, tales como BVDV y CSFV, a células susceptibles requiere la integridad del heterodímero E1-E2^{9,10}. Si bien la proteína E^{rns} es dispensable en el proceso, se ha reportado que tiene la capacidad de unirse a GAGs. Los GAGs están compuestos por unidades de disacáridos sulfatados. Heparán y condroitín/dermatán sulfatos son los GAGs principales expresados en la membrana de M ϕ ²¹². E^{rns} tiene la capacidad de unirse a heparina, fucoidán y dermatán sulfato, no así a condroitín sulfato y mananos³⁰. E^{rns} podría participar en estos procesos iniciales de unión inespecífica sin ser indispensables en la entrada viral. Hulst y col.²¹³ sostienen que E^{rns} se une de modo irreversible tanto a células susceptibles como no susceptibles al BVDV. Se ha reportado en cultivos primarios humanos, una mayor expresión de heparán sulfato en Mo que en linfocitos (aún en linfocitos estimulados con mitógeno), y aun mayor expresión en M ϕ -Mo humanos²¹⁴. Si este patrón fuera similar en bovinos, podría explicar el mayor tropismo del BVDV por el linaje monocítico en CMSP y la relevancia de los M ϕ -Mo al ser altamente susceptibles a la infección.

Otra posibilidad que deberíamos considerar es que E2 tenga capacidad de unión a más de un receptor de la membrana de los M ϕ , como es el caso de E^{rns} con capacidad de unirse a distintos GAGs. Si fuera el caso, el pre-tratamiento de las células con E2r podría bloquear más de un receptor e inhibir la infección, mientras que el pre tratamiento del virus con el anticuerpo neutralizante solamente bloquearía a E2, permitiendo que el virus se adhiriera mediante las otras glicoproteínas de envoltura. Se ha reportado que E2 y E^{rns} se unen a distintos receptores celulares²¹³. En este caso, el virus debería poder internalizarse utilizando otras glicoproteínas distintas de E2, en contraposición con lo reportado sobre líneas celulares^{9,10}. No obstante los cultivos primarios de M ϕ -Mo podrían ofrecer un escenario distinto. En un trabajo publicado por nuestro grupo, el mismo anticuerpo neutralizante que utilizamos en los ensayos con M ϕ -Mo¹⁶⁸ fue capaz de inhibir completamente la entrada en CD-Mo⁸¹, además la CI50 % de E2r fue mayor, sugiriendo que distintos linajes celulares no necesariamente presentan idénticos mecanismos de entrada.

4.3. Capítulo 3 - Interacción del BVDV con macrófagos derivados de monocitos perfilados

Se ha mencionado que la clasificación funcional de los M ϕ en M ϕ M1 proinflamatorios o M2 antiinflamatorios hoy en día es meramente didáctica y no refleja la complejidad observada *in vivo*. En muchos contextos fisiopatológicos estudiados coexiste en un tejido particular una mezcla de poblaciones de M ϕ de distinto fenotipo. Para llevar a cabo estudios funcionales en M ϕ que reproducen esos fenotipos *in vitro*, se los estimula con inductores típicos de perfiles M1 o M2.

Es importante destacar que, a la fecha, no existen reportes en la bibliografía en los que se estudien los perfiles de M ϕ en relación con la infección con el BVDV.

En este trabajo de tesis se emularon perfiles de M ϕ -Mo bovinos *ex vivo*, con M ϕ clásicos M1 proinflamatorios (estimulados con LPS), con mayor expresión de TNF- α y M ϕ M2 reguladores (estimulados con IL-4) con mayor actividad arginasa y producción de IL-10 (**Figura 3.1**). En estos M ϕ detectamos una expresión basal de IFNs que es consistente con lo reportado por la bibliografía (**Figura 3.2**)⁹². Esta producción basal sería necesaria para gatillar una respuesta rápida antiviral mediada por interferones en caso de infección viral. Detectamos presencia de IFN-I en las células M α con una concentración superior a 1,5 UI/ml. Este IFN-I corresponde al IFN- α bovino recombinante que se añadió de manera exógena para inducir M ϕ antivirales M α , a una concentración de 5 UI/ml, 24 horas previas a la cosecha de las células. Esta detección funciona como control positivo de la técnica. Los M ϕ se encuentran en un estado metabólicamente activo y son capaces de responder a un estímulo de IFN- α , secretando IFN- λ . Los IFN-I estimulan una oleada de ISG, entre estos el factor IRF7. IRF7 puede participar en una segunda oleada de producción de IFN-I y de IFN-III²¹⁵.

De manera acorde con el fenotipo M2, encontramos en los M ϕ estimulados por IL-4, aumentan su capacidad fagocítica (**Figura 3.4**), tal como se verifica en reportes bibliográficos^{107,180,181,216,217}.

Posteriormente los distintos perfiles fueron caracterizados con los estímulos inductores LPS, IL-4 e IFN- α en cuanto a los niveles de expresión de las moléculas de superficie. Ninguno de los marcadores evaluados presentó diferencias significativas provocadas por los tratamientos de acuerdo al porcentaje de células con detección positiva y el nivel de expresión de los marcadores utilizados (CD14, CD172a, CD205, MHC-I y CD86). Las moléculas CD14, CD172a y MHC-I se expresaron en prácticamente el 100 % de las células lo cual era esperable al tratarse de M ϕ -Mo.

Podemos hablar entonces de tendencias de los niveles de expresión de los marcadores. En los M ϕ M2 se observó una disminución en los niveles de CD14 y CD172a (**Figura 3.3**).

La mayoría de los reportes corresponden a estudios de polarización de M ϕ humanos y murinos. CD14 es el receptor de LPS, y se ha reportado que en M ϕ murinos es crítico para la polarización a M1 mediada por TLR2²¹⁸. Estudiando caracterización de M ϕ -Mo humanos en torno a su capacidad fagocítica, Schulz y col. establecieron que los M ϕ -Mo del espectro M2 tienen mayor capacidad fagocítica que los M ϕ -M1, y que a su vez estos M1 tenían baja expresión de CD14 (CD14^{low})¹⁸¹.

CD172a es un receptor inhibitorio de la fagocitosis que interactúa con el ligando CD47 el cual transmite una señal “*don't eat me*” (del inglés, “no me comas”) hacia el fagocito. De hecho, la inhibición de CD172a aumenta la fagocitosis en M ϕ humanos²¹⁹. En un trabajo con TAMs murinos la sobreexpresión inducida de CD172a y CD47 repolariza a los TAMs del espectro M2 hacia un perfil M1, con mayor actividad tumorigénica²²⁰. En nuestros M ϕ -Mo bovinos la expresión media de CD205 está aumentada ligeramente en M2 aunque con considerable dispersión. Este es un receptor carroñero de endocitosis con dominios de lectina tipo C, reportado como propio del perfil de M ϕ M2²²¹. Por último CD86, molécula coestimuladora típica marcadora de los M ϕ M1^{126,222,223} tiene mayor expresión (IFM) en el perfil M1. En conjunto estos resultados indican que logramos un perfil del espectro M2 en M ϕ -Mo mediante el tratamiento de estas células con IL-4 bovina.

El experimento descrito en este capítulo se realizó con 4 bovinos de los cuales se purificaron M ϕ -Mo. Se trata de animales exocriados en situación de campo, por lo que es necesario aumentar considerablemente el *n* de animales muestreados para que las diferencias inducidas por los tratamientos sean estadísticamente significativas. Los factores genéticos y ambientales también son relevantes en las funciones y fenotipo de los M ϕ -Mo. Thirunavukkarasu y col. estudiaron la producción de TNF- α , IL-10 y producción de NO en M ϕ -Mo bovinos estimulados con antígenos de micobacterias. En estos experimentos, las células fueron purificadas de animales *naïve* o con exposición previa a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) luego de 3 años de ocurrida la exposición. Dentro del grupo de animales expuestos a MAP, realizaron una clasificación como altos y bajos respondedores de acuerdo a la concentración sérica de IFN- γ . Los M ϕ -Mo purificados de los animales caracterizados como altos respondedores secretaban más NO ante una exposición a MAP *ex vivo*. También hubo una caída en la producción de IL-10 en M ϕ de animales previamente expuestos a MAP, frente a los M ϕ provenientes de animales no expuestos, luego de ser estimulados con antígenos de MAP *ex vivo*. Además, los Mo de los animales previamente expuestos al antígeno, presentaban mayor expresión de marcadores M1¹²⁶. Estos resultados indican que el fenotipo de los M ϕ -Mo

está influenciado por la historia previa del animal (exposición previa al antígeno) y/o por factores genético-ambientales (altos y bajos productores de IFN- γ), y que, en el caso de este estudio, la memoria entrenada de los Mo duró al menos 3 años.

Cuando estudiamos cómo afectaba la infección *ex vivo* a los marcadores en los M ϕ -Mo perfilados (CD14, CD172a, CD205, MHC-I y CD86), los resultados se volvieron altamente variables entre experimentos. Sin embargo, los M ϕ -M2 fueron los que resultaron infectados en mayor medida por el BVDV. Con este fenotipo se observó además que los niveles de IL-10 eran mayores que en los otros fenotipos, y que estos niveles prácticamente se duplicaban luego de la infección con el BVDV (**Figura 3.5**).

IL-10 es una citoquina reguladora reportada como inductora, al igual que IL-13, del fenotipo de M ϕ M2. Los efectos principales de la IL-10 son la inhibición de la secreción de IL-2 por parte de los linfocitos Th1, la regulación negativa de la producción de moléculas del MHC de clase II y citoquinas (p. ej., IL-12) por parte de Mo, M ϕ y CD y, por lo tanto, inhibición de la diferenciación de linfocitos Th1 e inhibición de la proliferación del linfocito T. La relevancia clínica de la IL-10 incluye la posible supresión de la respuesta inmunitaria²²⁴. Existen antecedentes del aumento de IL-10 luego de la infección viral. Se ha reportado, por ejemplo, que en infecciones *ex vivo* en M ϕ con el PRRSV se produce un aumento de la expresión de IL-10 y a la vez se ven inducidos M ϕ de todo el espectro M2. Por otro lado, el perfil de M ϕ mediado por IL-10, fue el más permisivo a la infección⁹².

La producción de IFNs en sobrenadantes, determinada a las 24 hpi luego de la infección con BVDV, se mantuvo en niveles apenas detectables por la técnica. Esto es consistente con lo reportado en bibliografía, donde los M ϕ exhiben una producción basal de IFN-I y III y donde las cepas ncp de BVDV no inducen la producción de IFNs en M ϕ , en contraposición con las cepas cp^{49,142,143}.

Los M ϕ -Mo estimulados con IFN- α bovino fueron refractarios a la infección con el BVDV y casi no se detectó replicación intracelular, ni producción de partículas virales nuevas.

Fue llamativo que el IFN- α no protegiera de la infección con 98-124 a las CMSP (provocó una caída no significativa en los niveles medios de replicación viral). No obstante, dentro de estas células el BVDV replica principalmente en el linaje monocítico, y mantiene replicación alta entre los M ϕ -Mo.

Los IFN-I y III comparten las mismas vías de señalización, aunque con receptores distintos. El receptor de los IFN-I presenta una distribución ubicua en los tejidos, mientras que el receptor de IFN-III se encuentra restringido principalmente en los epitelios y células inmunes. Esta característica confiere sensibilidad diferencial a los IFN-I y III a distintos tejidos: casi todas las

células son sensibles a los IFN-I, mientras que los IFN-III actúan principalmente a nivel de los epitelios, actuando como un antiviral específico de las vías de entrada de los virus²²⁵.

Los Mo humanos son insensibles a IFN- λ , y el receptor va adquiriéndose paulatinamente durante la diferenciación a M ϕ ²²⁶. La ausencia de receptor en Mo podría explicar la falta de cambios en la replicación viral entre las CMSP tratadas con IFN- λ y las no tratadas. Recientemente se ha reportado una regulación positiva de ISGs en M ϕ , pero no en Mo humanos en respuesta a agonistas de TLR4²²⁷. Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado reportes de sensibilidad diferencial en M ϕ -Mo y en Mo a IFN-I o bien en la expresión de su receptor. Los resultados obtenidos parecerían indicar que el IFN- α es más efectivo en bloquear la replicación viral por 98-124 en M ϕ -Mo que en Mo.

La actividad fagocítica es una característica diferencial entre M ϕ de distinto fenotipo, siendo superior en los M ϕ M2^{174,180,181}, tal como se verificó en este trabajo. La infección con nuestra cepa de trabajo produce un aumento de la fagocitosis (post-infección) independientemente del perfil de los M ϕ (**Figura 3.6**). Este hallazgo se contrapone con lo reportado en M ϕ -Mo infectados con el BVDV, en donde una cepa ncp de alta virulencia¹⁴⁴ y una cepa cp¹⁴⁷ reducen la fagocitosis *ex vivo*, mientras que una cepa cp también reduce la fagocitosis con M ϕ alveolares *in vivo*¹⁵⁰. Por otro lado, Pedrera y col. reportaron alta actividad fagocítica en M ϕ presentes en placas de Peyer de animales infectados, además numerosos M ϕ tenían señales de infección viral, no obstante, el trabajo no establece una relación cuantitativa entre aumento de fagocitosis e infección viral⁸⁹.

Dados nuestros resultados con M ϕ M2 estimulados con IL-4: fagocitosis aumentada (**Figura 3.4**), CD14 y CD172a con tendencia a la disminución (**Figura 3.3**), actividad arginasa aumentada y mayor producción de IL-10 (**Figura 3.1**); es tentador hipotetizar que cuando estos M ϕ -Mo son infectados por el BVDV estarían transitando aún más hacia un extremo del espectro M2 potenciado por la infección (**Figuras 3.5, 3.6 y 3.12**). El aumento de la fagocitosis ocurre incluso en M ϕ pro-inflamatorios infectados. La presencia de BVDV también induce un aumento significativo de la fagocitosis en M ϕ M α , que son prácticamente refractarios a la infección. A este respecto, Sang y col. proponen a los M ϕ antivirales como una forma operativa relativamente independiente de los estados M1 o M2, donde la estimulación de M ϕ con IFN-I activa vías de señalización canónicas compartidas que conducen a características típicas de M1 y M2⁹².

Como se ha mencionado más arriba, los virus monocitotrópicos tienen dos estrategias a la hora de infectar M ϕ : infectar un perfil favorable de infección (M2, regulador), y/o modular a los M ϕ hacia el perfil favorable. Hemos comprobado que para el BVDV el fenotipo favorable de infección son los M ϕ M2. Nos resta evaluar si el virus es capaz de modular a los M ϕ hacia el

perfil favorable, lo cual consideramos altamente probable dado que la infección de M ϕ M2 aumenta la expresión de IL-10, una citoquina capaz de inducir un perfil anti-inflamatorio en estas células⁹².

Existen múltiples reportes sobre polarización de M ϕ *ex vivo* en bovinos, no solamente respecto del tipo de mediador utilizado, sino sobre posibles combinaciones de tratamientos, concentración, tiempos del estímulo, medio de cultivo, etc.^{116,117,126,138,139}.

Utilizamos por tanto, diferentes tratamientos en M ϕ -Mo adherentes para determinar si los resultados obtenidos hasta entonces con la cepa 98-124 eran extensivos a otras cepas y otros tratamientos. El experimento incluyó distintos estímulos inductores de polarización M1 por bibliografía (LPS, IFN- γ) y M2 (IL-4, azitromicina) y distintas cepas de BVDV de genotipo 1 y 2 y biotipos cp y ncp (**Figura 3.11**). Los M ϕ -Mo fueron obtenidos de cuatro animales. Fue sorprendente la mayor actividad arginasa de los M ϕ estimulados con LPS, propia del perfil M2, y la replicación aumentada en estos M-LPS, tanto a nivel intracelular como en la producción de partículas virales extracelulares. Encontramos una fuerte asociación con alta significancia estadística entre actividad arginasa y replicación y esto resultó independiente del estímulo que recibieron las células y del genotipo y biotipo de la cepa infectante. Esto es un punto relevante ya que nos permite independizarnos del estado de las células en los diferentes animales tomando a la arginasa como indicador de perfil M2.

En la primera parte de este trabajo de tesis (Capítulo 3) cuando se caracterizaron los M ϕ -Mo de diferentes perfiles luego de ser tratados con LPS o IL-4 como M1 y M2 respectivamente, había consistencia en el perfilado en distintos experimentos y con distintos animales. Sin embargo, el tratamiento de los M ϕ -Mo con LPS en experimentos posteriores, comenzó a producir un perfil antiinflamatorio (los posibles motivos se explican más abajo). Por lo tanto, la decisión fue utilizar IFN- γ como estimulante para producir el perfil M1 ya que en los diferentes experimentos los resultados eran consistentes. No obstante, cabe señalar que en todas las preparaciones de M ϕ -Mo de los primeros experimentos (utilizando la tecnología MACS), el tratamiento con LPS indujo un perfil M1, por lo que podemos confiar en los resultados obtenidos con estos cultivos. El punto más relevante es que en todos los casos se observó una mayor replicación del virus en M ϕ -Mo con perfil antiinflamatorio. independientemente del tratamiento que recibieron las células, lo cual fue verificado al medir actividad arginasa.

Los M ϕ -M1 expresan la enzima NO sintetasa la cual sintetiza NO y citrulina a partir de arginina. El NO participa de múltiples procesos, inhibiendo directamente la replicación viral por nitración específica de proteínas esenciales para la replicación del ARN²²⁸. Además, el NO es sustrato de RNS con actividad microbicida. Los M ϕ -M2 expresan la enzima arginasa que hidroliza arginina a ornitina y urea. Al competir por el mismo sustrato, la actividad arginasa

limita la producción de NO. La ornitina además ingresa en las vías metabólicas de las poliaminas y prolinas que son factores importantes en proliferación celular y reparación del tejido¹⁰⁵.

La actividad arginasa como sello de perfil M2 se encuentra ampliamente aceptada^{96,104-107} y la asociación entre actividad arginasa y mayor replicación viral ha sido reportada para virus de diversas familias²²⁸ incluido el género *Pestivirus*²²⁹. Por tanto, no debe sorprendernos la asociación arginasa y replicación, no obstante, esto da cuenta de la complejidad de los M ϕ del espectro M2. En el experimento donde se utilizaron múltiples cepas y estímulos, los M-LPS se comportaron funcionalmente como M ϕ del espectro M2 (alta actividad arginasa y replicación viral), los M-Az y los M-IL-4, presentaron alta actividad arginasa, significativamente menor que los M-LPS, pero aumentada respecto a los M-IFN- γ . Los M-Az soportaron alta replicación viral, y por otro lado, los M-IL-4 presentaron muerte celular masiva tras la infección por cepas cp. Los M-IFN- γ en contraposición, fueron los que menos replicación viral soportaron, presentando baja actividad arginasa, comportándose de acuerdo al estímulo utilizado, como típicos M ϕ M1.

Estos resultados obtenidos a partir de M ϕ adherentes estimulados con LPS nos llevaron a pensar que el método de purificación de los Mo podría estar afectando al fenotipo de los M ϕ obtenidos. En principio habíamos constatado que las poblaciones purificadas por ambas técnicas eran equivalentes en cuanto a la expresión del marcador CD14. Como ya se ha señalado, se han descrito 3 grupos de Mo bovinos clasificados, al igual que en humanos, de acuerdo al balance en la expresión de los marcadores CD14 y CD16¹³². Dentro del conjunto de células monocíticas hay una pequeña población que representa en torno al 5 % de estos Mo, que son CD14⁻, y que en principio no quedaría retenida en las columnas por el sistema MACS, pero sí estaría presente en la población de M ϕ adherentes. Además, cada subgrupo de Mo expresa de forma variable las moléculas CD18 y CD11a, CD11b y CD11c las cuales son componentes del heterodímero de membrana de la familia integrina β , importante en la adherencia de los Mo al endotelio y al plástico²³⁰, aportando de esta manera pequeñas variaciones adicionales sobre la población celular.

CD14 es un receptor de superficie de la línea monocítica con capacidad de unión a LPS y a la proteína de unión a LPS. Elkord y col. encontraron que el método de purificación por MACS torna a las CD-Mo humanas insensibles a secretar citoquinas al ser estimuladas por LPS, y no así a los CD purificadas por adherencia. Los autores sugieren que las anti-CD14 magnéticas utilizadas en la separación por MACS podrían estar interfiriendo en la respuesta al unirse a CD14, aunque el mecanismo de acción se desconoce²³¹. Recientemente, se han reportado diferencias en el fenotipo de M ϕ humanos obtenidos a partir de Mo purificados por ambas

técnicas²³². Algunos trabajos han reportado la capacidad de producir tolerancia y anergia en M ϕ y Mo expuestos a LPS^{92,233,234}.

A las diferencias aportadas por la metodología en la purificación, se suma la complejidad intrínseca de los M ϕ . Montoya y col. hicieron una caracterización exhaustiva de M ϕ -Mo y CD-Mo bovinos. Encontraron que Mo diferenciados con GM-CSF, IL-4 y Flt3L daban como resultado cultivos de células adherentes y no adherentes. Cada fracción de células adherentes y no adherentes estaba representada por una mezcla heterogénea de CD-Mo y M ϕ -Mo, sin embargo, no había manera de predecir la proporción de células de cada tipo de acuerdo a su capacidad de adherencia y estas proporciones eran irreproducibles entre experimentos, incluso cuando éstos eran realizados con un mismo animal¹¹⁶. Estos resultados indican la dificultad intrínseca de trabajar con cultivos primarios de M ϕ bovinos.

En nuestro experimento donde se purificaron M ϕ -Mo por adherencia o por el sistema MACS a partir de un mismo animal (**Figura 3.13**), se observó que normalizando los valores de actividad arginasa a la cantidad de proteínas presente en cada muestra (para poder realizar comparaciones directas entre sistemas), la actividad arginasa global de los M ϕ -Mo adherentes fue significativamente mayor que la de los purificados por la tecnología MACS. Por lo tanto, y en base a estos resultados, se puede concluir que ambos sistemas de purificación de Mo no proporcionan células equivalentes para diferenciar a M ϕ -Mo, aunque sí lo sean para el marcador CD14. Sin embargo, si se considera cada sistema por separado, éstos presentan una coherencia interna con valores medios de actividad arginasa que siguen el mismo orden M-LPS > M-IL4 > M-IFN- γ . Es decir que con ambos sistemas se obtienen perfiles funcionales de M ϕ M1 y M2, aunque las células no sean totalmente equivalentes. Es importante considerar que trabajar con células adherentes no solamente disminuye costos, sino que posibilita aumentar el número de animales que se pueden incluir en un mismo procedimiento. Es probable que, en este experimento particular, los M-LPS se comporten en realidad funcionalmente como M ϕ de fenotipo M2, independientemente del método utilizado para purificar los Mo, y probablemente asociado al status fisiológico (o fisiopatológico) del animal del cual fueron purificados.

Esta idea nos condujo a considerar qué sucedía con los M ϕ -Mo provenientes de animales con distinto status fisiológico y rango etario, a su vez relacionados con la mayor susceptibilidad y morbilidad frente a las infecciones con el BVDV: vacas atravesando el primer trimestre de preñez, terneros menores de dos meses y vacas no preñadas. Se comprobó que los M ϕ -Mo purificados de vacas preñadas y terneros presentaban una actividad arginasa significativamente mayor que la medida en M ϕ -Mo provenientes de animales adultos (**Figura 3.14**). Este dato es consistente con la patogenia del proceso infeccioso. La preñez es un

periodo especialmente vulnerable a la infección por el BVDV, ya que durante esta etapa tiene lugar el periodo ventana de contagio donde el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria y generar el nacimiento de terneros PI. Se ha reportado mayor prevalencia de infecciones por BVDV cuanto menores eran los terneros²³⁵. Por otro lado, las manifestaciones clínicas en terneros son más severas que en adultos, sobretodo asociado a infecciones bacterianas secundarias²³⁶. Para enfermedades virales en general, los animales jóvenes o el feto durante la preñez, son más vulnerables a infecciones por patógenos intracelulares y presentan mayor proporción de M ϕ y Mo de fenotipo M2 que sus representantes adultos¹¹⁵. Cabe señalar que una asociación estadística entre actividad arginasa y vulnerabilidad de los animales a infecciones virales no implica necesariamente que existe una relación causal, no obstante, resulta concebible que en un contexto angiogénico y de crecimiento propio del perfil M2, probablemente se vea favorecida la infección por el BVDV y esto guarde relación con la inmunopatogenia observada *in vivo*.

Por último, se analizó la entrada del BVDV en M ϕ -Mo adherentes estimulados con inductores típicos de perfil M1 (LPS, IFN- γ) y M2 (azitromicina, IL-4) utilizando la E2r, tal como hicimos con los M ϕ -Mo sin perfilar (**Figura 3.15**).

Encontramos distintos niveles de replicación en células perfiladas sin tratamiento con E2r, tal como había sucedido en otros experimentos, con mayor replicación en los perfiles M2. Curiosamente casi no hubo replicación en los M ϕ estimulados con LPS, tal como sucedía con los M ϕ -Mo purificados por la tecnología MACS (**Figura 3.5**), donde el tratamiento con LPS generaba un perfil funcional de M ϕ M1, lo que refuerza la idea de que el método de purificación de Mo probablemente no afectó a los resultados y posiblemente factores genéticos y/o ambientales jueguen un papel relevante en estas células, donde el LPS viene a exacerbar un fenotipo pre-existente.

En este punto, nos planteamos que el diferente grado de replicación de BVDV en los distintos fenotipos de M ϕ -Mo puede deberse a dos mecanismos, (i) un mecanismo intrínseco presente en estas células, que les confieren distintos grados de susceptibilidad a la infección, o bien que (ii) hay una adsorción viral diferencial en la superficie de los M ϕ de distintos perfiles y que esto conduce a distintos grados de internalización y replicación viral.

Si la primera hipótesis es correcta, los distintos perfiles de M ϕ expresarían la misma densidad de receptores al BVDV en la membrana celular, de modo que los pre-tratamientos con la proteína E2r que bloquea estos receptores celulares, darían como resultado el mismo grado de inhibición entre distintos perfiles de M ϕ . Si por el contrario, los M ϕ de distintos perfiles expresan distintas densidades de receptor en su superficie, E2r se uniría de manera diferencial a la membrana celular, dando como resultado, distintos grados de inhibición.

Una manera de analizar el grado de inhibición, es estudiando las ABC normalizadas, asignando un valor de replicación del 100 % a las células infectadas pero no tratadas con E2r. De esta manera es posible comparar las ABC entre fenotipos de M ϕ de forma independiente a la replicación diferencial del virus en las células sometidas a los distintos tratamientos.

Comprobamos que el ABC es mayor en los perfiles funcionales M2 (azitromicina e IL-4) que en los perfiles M1 (IFN- γ y LPS), abonando la idea de que estos M ϕ -M2 expresarían mayor densidad de ligandos del BVDV tornándose más susceptibles a la infección (**Figura 3.17**). Esta hipótesis es consistente con lo reportado en bibliografía, donde los M ϕ M2 expresan mayor cantidad de GAGs en superficie y de diferente especificidad^{212,214}. No obstante, es necesario señalar que la replicación intracelular determinada por ELISA es un mecanismo indirecto para confirmar definitivamente la hipótesis y probablemente sea una técnica poco sensible para encontrar diferencias sutiles en la adsorción de E2r en la superficie celular. Sin embargo, aún así se han encontrado diferencias importantes en los valores de ABC normalizadas entre los perfiles inducidos M1 y M2. Incluso hay diferencias significativas entre el ABC de los distintos perfiles M2.

Las situaciones hipotéticas planteadas pueden representar ejemplos extremos. La segunda hipótesis de mayor pegado de E2r en superficie no excluye a la primera, es decir, podría haber mayor adsorción viral en superficie de los M ϕ M2, y que este fenómeno derive en mayor replicación y que además, estas células presenten mayor producción viral por otro mecanismo intrínseco. De todos modos queda pendiente la detección directa de E2r en la superficie de los M ϕ -Mo perfilados para confirmar estos resultados.

Es intrigante el rol de la fagocitosis en este contexto, que aumenta en todos los casos con la infección. Dado que nuestro ensayo de fagocitosis fue realizado con bacterias que son partículas de gran tamaño, el mecanismo de internalización se encontraría restringido a la fagocitosis mediada por actina⁹⁴, en contraposición a la clásica entrada por endocitosis mediada por clatrina descrita para el BVDV³⁷. Hasta el momento no se ha reportado infección viral de células fagocíticas por el BVDV por un mecanismo de escape a la fagocitosis, pero es interesante explorar esta posibilidad dada la resistencia que presentan los *Pestivirus* a la inactivación ácida, siendo capaces de escapar del endosoma tardío³⁶.

4.4. Capítulo 4 - Experimentos *in vivo*

En los capítulos anteriores se estudió la interacción de M ϕ -Mo bovinos con el BVDV. Se decidió luego refrendar los resultados *in vivo*. Como se ha mencionado más arriba, existen numerosos

reportes de la utilización de azitromicina como inductor de perfil M ϕ -M2 *in vitro*^{173,174,184} y en el modelo murino^{170-172,182,183}. La azitromicina actúa inhibiendo STAT1 y NF- κ B¹⁷³ y se acumula en Mo²³⁷. La hipótesis, de los dos experimentos *in vivo* realizados en este trabajo de tesis, fue que la azitromicina sería capaz de inducir un perfil de M ϕ -M2 *in vivo*, y que este fenómeno se traduciría en mayor actividad arginasa y mayor replicación del BVDV en los M ϕ , provocando mayores niveles de viremia o un inicio más temprano de la misma.

Zhang y col. utilizaron azitromicina en el modelo de C57Black para perfilar M ϕ -M2 en el contexto de una contusión torácica, hipotetizando que los ratones que reciben azitromicina tendrían una mejor recuperación relacionada con la respuesta angiogénica propia del perfil M2. Se aplicaron dosis diarias de azitromicina durante 3 días previos al trauma. Solamente observaron diferencias en los parámetros evaluados los días 3 y 7 posteriores a la lesión. A los 28 días ya no se observaron diferencias entre grupos, no obstante la recuperación de los animales que recibieron azitromicina fue más favorable¹⁷¹. Feola y col. utilizaron un esquema similar, aplicando azitromicina por 4 días previos con la misma dosis en el contexto de una infección pulmonar con *Pseudomonas aeruginosa*. Encontraron un pico de actividad arginasa el día 7 post tratamiento¹⁷². Estos trabajos no reflejaron ningún cambio producto del tratamiento con azitromicina respecto a los controles, sino que las diferencias aparecieron posteriores a la contusión o a la infección. En base a estos antecedentes se diseñó un experimento que incluyera la infección con el BVDV porque el tratamiento solo con azitromicina podría no reflejar cambios en los M ϕ .

Recientemente nuestro grupo ha publicado un modelo de infección del BVDV en ratones BALB/c con la cepa de estudio de esta tesis BVDV 98-124. En este modelo se produce un estado de viremia sostenida en el tiempo, al menos hasta 56 dpi, que no causa signos clínicos en el ratón y que alcanza un pico máximo de replicación viral en torno al día 7 dpi. No se detectaron lesiones en corazón, cerebro, hígado, bazo, riñón, órganos linfoides mesentéricos y tampoco fue posible detectar al virus en estos órganos, detectándose solamente en la sangre¹⁷⁵. Basados en este modelo se diseñó el experimento pre-tratando un grupo de ratones con azitromicina, incluyendo un grupo tratado con azitromicina e inhibidor de arginasa, más el grupo control, tal cual se describió en la metodología. La dosis y vía de administración, así como la dosis del inhibidor de arginasa ABH fue tomada de Amantea y col.¹⁷⁰. En este trabajo los autores utilizaron ratones C57Black. Si bien el modelo animal pertenece a otra cepa, existen otros reportes de tratamientos de ratones BALB/c con azitromicina para perfilar M ϕ , incluso por la vía IP, que es la que se utilizó en nuestro experimento^{182,183}. Los tiempos elegidos para el sacrificio de animales, obedecen a la cinética de replicación de 98-124 en nuestro

modelo¹⁷⁵. Pensando en que se podrían detectar diferencias exacerbadas por la utilización de azitromicina se incluyeron evaluaciones a tiempos cortos, previos al pico de replicación.

El modelo no fue adecuado esencialmente porque no se registró replicación en los M ϕ peritoneales. Si bien los M ϕ peritoneales registraron mayor producción de arginasa el día 2 y 7, los valores fueron similares a los obtenidos por los M ϕ pertenecientes al grupo ABH (**Figura 4.2**). Es posible que no se hayan detectado cambios más profundos en la actividad arginasa de M ϕ , porque estas células “no vieron” al virus. Tal como sucedió en otros trabajos, los efectos inmunomoduladores de la azitromicina podrían manifestarse después de la infección o trauma. En nuestro caso, el curso de la infección se mantuvo subclínico para los 3 grupos experimentales hasta el fin del experimento, detectándose viremia en suero en niveles comparables entre grupos.

El modelo murino de infección por BVDV fue publicado por primera vez por Seong y col. en 2015. Desde entonces los investigadores publicaron varios trabajos infectando con distintas cepas de BVDV de genotipo 1 y 2 por distintas vías de inoculación (intranasal, oral, IP). En los primeros trabajos utilizaron las cepas BVDV-1 (472) y BVDV-2 (001) aisladas en Corea para realizar una infección experimental en ratones BALB/c. Los ratones no presentaron señales de enfermedad clínica, no obstante detectaron virus en bazo, nódulos linfoides mesentéricos, pulmón y tejido linfático asociado, estómago, intestinos y tejido linfoide asociado, corazón, riñón e hígado. La histopatología reveló depleción de linfocitos en el bazo^{185,186}.

El mismo grupo infectó ratones BALB/c por la vía oral con la cepa NADL cp de BVDV-1. Los ratones desarrollaron signos clínicos de enfermedad (diarrea leve, pérdida de apetito, y reducción de movilidad y consumo de agua). Encontraron antígenos virales en bazo, médula ósea y linfonódulos mesentéricos. La histopatología reveló además lesiones en riñón¹⁸⁷.

En otro trabajo utilizaron una cepa ncp coreana BVDV-1b (aislamiento 11Q472) e infectaron por la vía oral. No hubo señales de enfermedad clínica. Encontraron al virus en distintos órganos, pero sin lesiones asociadas¹⁸⁸. En 2018 utilizaron la cepa ncp de BVDV-2 también por la vía oral (BVDV-2a, 11F001). Nuevamente no hubo manifestación clínica de la enfermedad aunque encontraron lesiones histopatológicas en el bazo. Curiosamente, no había coincidencia entre la presencia de antígenos virales y lesiones histopatológicas¹⁸⁹.

El único trabajo perteneciente a otro grupo de investigadores en el modelo murino de infección por BVDV (al margen de nuestra publicación), fue un estudio realizado por Liu y col. en 2021. Utilizaron el modelo BALB/c infectando con las cepas NADL (1a cp) y NY-1 (1b ncp) por la vía IP. Los autores no encontraron señales clínicas de enfermedad provocada por ninguna de las dos cepas utilizadas. No obstante, detectaron antígenos virales en distintos órganos además de lesiones histopatológicas¹⁹⁰. En ninguno de los trabajos citados se

menciona la búsqueda de virus en M ϕ peritoneales o en M ϕ de ningún tipo y tejido. Dado el marcado tropismo por el linaje monocítico observado por el BVDV en bovinos y la alta replicación en M ϕ -Mo *ex vivo*, los M ϕ peritoneales murinos parecían *a priori* un buen candidato donde detectar al virus porque como se ha mencionado, en nuestro modelo de infección publicado de BALB/c no se pudo detectar en otro tejido fuera de la sangre¹⁷⁵.

Dada la imposibilidad de poder contrastar la hipótesis utilizando el modelo ratón, se intentó inducir la polarización de Mo *in vivo* en bovinos, el hospedador natural del BVDV. Gran parte de los estudios sobre polarización de M ϕ bovinos se han realizado en el contexto de la tuberculosis bovina, donde los M ϕ tienen un rol central en la formación de granulomas^{121,122,124,129,136}. En estos trabajos los M ϕ se inducen o caracterizan *ex vivo* tal como se hizo en gran parte de esta tesis, y/o se caracterizan *in vivo*, pero según la bibliografía, hasta el momento no se ha intentado inducir un tipo determinado de M ϕ en estos animales tal como se hizo en el modelo murino.

Se utilizó azitromicina nuevamente para inducir un perfil de M ϕ -M2 *in vivo*. Dado que es un antibiótico de amplio espectro, ya había sido utilizado en bovinos por su actividad antimicrobiana de forma experimental^{176,238}. Como se ha mencionado, la primera dosis de azitromicina IV en forma de bolo causó efectos adversos en un ternero. Existen reportes de aplicación de azitromicina IV en forma de bolo en vacas¹⁷⁶, ovejas²³⁹, gatos²⁴⁰ y ratas^{241,242} con dosis iguales o superiores a la que se aplicó en nuestro experimento, donde no se reportaron efectos adversos. No obstante, por seguridad se cambió al esquema oral. De todos modos, los tres animales dentro del grupo recibieron exactamente el mismo tratamiento. Para intentar inducir un perfil proinflamatorio, otro grupo experimental se inoculó con un adyuvante oleoso. Pevio al inicio del experimento, todos los animales tenían la bilirrubinemia total aumentada teniendo en cuenta los valores de referencia disponibles¹⁹². Sin embargo, es necesario señalar que los animales estaban sanos, sin signología clínica de ningún tipo y bajo la supervisión de la veterinaria del Campo Experimental del CNIA. Además no existe información detallada acerca de valores normales de referencia discriminados por raza, tipo de explotación, rangos etarios, etc., por lo que no se puede asegurar que se trate de valores anormales para estos terneros. Respecto a la PrCR, no puede descartarse que 2 de los 9 animales presentaran un proceso inflamatorio agudo previo al inicio del experimento porque sus valores estaban por encima de las referencias hasta el día 5, y luego alcanzaron valores normales el día 7. Estos animales pertenecían al grupo Azitromicina, el grupo que fue justamente tratado para inducir una respuesta antiinflamatoria. Para el día 5, la producción de IFN- γ estaba aumentada de manera no significativa en el grupo Azitromicina. Este aumento no puede atribuirse a los dos terneros con la PrCR aumentada, dado que un animal que presentaba IFN- γ elevado, presentaba PrCR

normal al inicio del experimento. La actividad arginasa sérica también estaba aumentada de manera no significativa en el grupo Adyuvante el día 5 (**Figura 4.4**).

La mayor replicación en el grupo Azitromicina se observó en el día 5 post-infección en CMSP, tanto a nivel intracelular (NS3) como en los sobrenadantes de cultivo (titulación viral). Las diferencias fueron definidas como tendencia ya que no fueron significativas estadísticamente, y esto se debió a una alta variación de los valores entre individuos (**Figura 4.5**). Para M ϕ -Mo obtenidos del grupo Azitromicina en el día 7, la actividad arginasa y la replicación se encuentran aumentados respecto de los otros grupos experimentales, con considerable desviación entre individuos. Este resultado al igual que el de CMSP, son coincidentes con nuestra hipótesis, pero no tuvieron la potencia estadística necesaria para poder concluir que se deben a los tratamientos aplicados. Es llamativa la coincidencia entre actividad arginasa y replicación tal como se observó en otros experimentos (**Figura 4.6**). Como se mencionó en los resultados, si bien la asociación realizada mediante el Test de Fisher no tiene la potencia estadística necesaria por contar con un n bajo para realizar un análisis con el 95 por ciento de confianza, la asociación se ve respaldada por otros resultados a lo largo de la tesis.

Los M ϕ -Mo de los días 5 y 7 llevaban 8 días de cultivo al momento de infectarse *ex vivo*, y 9 días al momento de cosechar las células. No es posible afirmar de forma categórica si el estímulo que recibieron cuando estaban en el animal pudo ejercer efectos 8-9 días después. No obstante, sí observamos diferencias significativas en M ϕ -Mo provenientes de animales de distintos status fisiológico, por lo que podríamos esperar también observar diferencias inducidas por los tratamientos. Los Mo circulan en sangre de 3 a 5 días donde pueden recibir un entrenamiento inflamatorio o bien de inmunotolerancia que puede marcar su destino como Mo y M ϕ -Mo²⁴³.

Este experimento fue una prueba de principio para dilucidar si la azitromicina era capaz de inducir perfiles en M ϕ -Mo. La actividad arginasa aumentó de manera significativa en los M ϕ -Mo del día 7 en los 3 grupos experimentales, pero más aún para el grupo Azitromicina, por lo que hubiera sido interesante explorar qué sucedía en tiempos posteriores, y en un mayor número de animales. Un experimento más completo debería incluir más animales y una infección experimental *in vivo* post tratamiento, analizando qué sucede en tiempos posteriores. Cabe señalar que la infección experimental de estos animales por vía intranasal no pudo realizarse por la pandemia, que impidió la utilización de los boxes para animales grandes en el laboratorio BSL-2 del IVIT, que al día de hoy no han vuelto a ser utilizados. A pesar de las limitaciones mencionadas, la replicación se vio aumentada en el grupo azitromicina el día 5 en CMSP, y se evidencia una relación entre la actividad arginasa de los M ϕ -Mo inducida *in vivo* y la mayor infectividad del BVDV en M ϕ -Mo el día 7, constituyendo un modelo promisorio para

el estudio de interacciones de M ϕ de distinto perfil funcional con el BVDV u otros patógenos *in vivo*.

5. CONCLUSIONES FINALES

El BVDV es un patógeno inmunosupresor del ganado bovino que causa pérdidas económicas a nivel global. La enfermedad clínica aguda tiene una duración breve, extendiéndose entre 3 y 14 días, siendo resuelta enteramente por la inmunidad innata. Sin embargo, el papel de los M ϕ como células centrales de la inmunidad innata se encuentra pobremente estudiado. En este trabajo de tesis se pudo demostrar que el BVDV tiene un tropismo preferencial por las CPA y particularmente por el linaje monocítico, que lo convierte en un patógeno eminentemente monocitotrópico.

Los M ϕ son células polifuncionales con una alta heterogeneidad y plasticidad fenotípica que realizan funciones proinflamatorias de eliminación de patógenos, y reguladoras de re-establecimiento de la homeostasis. En este contexto, la capacidad del BVDV de modular a los M ϕ para favorecer su permanencia y diseminación juega un papel relevante prácticamente inexplorado.

Este trabajo constituye la primera evidencia de interacción diferencial del BVDV con M ϕ de diferente fenotipo. Este virus infecta preferencialmente M ϕ -Mo de fenotipo M2.

Las conclusiones finales de este trabajo son:

- El BVDV presenta un tropismo preferencial por el linaje monocítico.
- Se logró clasificar por primera vez a los M ϕ -Mo bovinos en los perfiles funcionales M1, M2 en base a su actividad arginasa, capacidad fagocítica, marcadores de superficie y niveles de expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias.
- El BVDV presenta un tropismo preferencial por el fenotipo alternativamente activado de M ϕ bovinos (M2) produciendo mayor progenie viral en estas células.
- La infección de los M ϕ M2 induce la expresión de IL-10, una citoquina capaz de promover el fenotipo antiinflamatorio.
- La infección de los M ϕ -Mo con el BVDV produce un aumento en la fagocitosis que es independiente del fenotipo de estas células.
- El tropismo diferencial sobre los distintos fenotipos de M ϕ estaría mediado, al menos en parte, por una mayor adsorción de la proteína viral E2 en la superficie de estas células.

- Los M ϕ -Mo provenientes de terneros y vacas preñadas poseen una mayor actividad arginasa respecto de las mismas células provenientes de vacas adultas, lo que podría guardar relación con diferente susceptibilidad a la enfermedad en estos grupos.
- Por primera vez se estimularon bovinos para inducir un entrenamiento sistémico de los M ϕ -Mo *in vivo*. Si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas, las CMSP provenientes de estos animales, presentaron mayor replicación viral y los M ϕ -Mo presentaron mayor replicación y actividad arginasa el día 7 del inicio de los tratamientos, constituyendo un modelo promisorio para el estudio de los M ϕ en el hospedador natural del BVDV.
- Existe una fuerte asociación entre actividad arginasa y la replicación viral. Esta asociación fue independiente del genotipo y el biotipo de la cepa infectante, así como del estímulo inductor de los diferentes fenotipos en los M ϕ -Mo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Vet J*. Published online 2014. doi:10.1016/j.tvjl.2013.07.024
2. Bauermann F V., Ridpath JF. HoBi-like viruses--the typical "atypical bovine pestivirus." *Anim Heal Res Rev*. 2015;16(1):64-69. doi:10.1017/S146625231500002X
3. Simmonds P, Becher P, Bukh J, et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J Gen Virol*. 2017;98(1):2-3. doi:10.1099/jgv.0.000672
4. Smith DB, Meyers G, Bukh J, et al. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *J Gen Virol*. 2017;98(8):2106-2112. doi:10.1099/jgv.0.000873
5. Callens N, Brügger B, Bonnafous P, et al. Morphology and Molecular Composition of Purified Bovine Viral Diarrhea Virus Envelope. *PLoS Pathog*. 2016;12(3). doi:10.1371/journal.ppat.1005476
6. Lazar C, Zitzmann N, Dwek RA, Branza-Nichita N. The pestivirus Erns glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology*. 2003;314(2):696-705. doi:10.1016/S0042-6822(03)00510-5
7. Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, McCauley JW. Role for Bovine Viral Diarrhea Virus Erns Glycoprotein in the Control of Activation of Beta Interferon by Double-Stranded RNA. *J Virol*. 2004;78(1):136-145. doi:10.1128/jvi.78.1.136-145.2004
8. Al-Kubati AAG, Hussen J, Kandeel M, Al-Mubarak AIA, Hemida MG. Recent Advances on the Bovine Viral Diarrhea Virus Molecular Pathogenesis, Immune Response, and Vaccines Development. *Front Vet Sci*. 2021;8:475. doi:10.3389/FVETS.2021.665128/BIBTEX
9. Ronecker S, Zimmer G, Herrler G, Greiser-Wilke I, Grummer B. Formation of bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *J Gen Virol*. 2008;89(9):2114-2121. doi:10.1099/vir.0.2008/001792-0
10. Wang Z, Nie Y, Wang P, Ding M, Deng H. Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology*. 2004;330(1):332-341. doi:10.1016/J.VIROL.2004.09.023
11. Yu H, Grassmann CW, Behrens S-E. Sequence and Structural Elements at the 3'

- Terminus of Bovine Viral Diarrhea Virus Genomic RNA: Functional Role during RNA Replication. *J Virol.* 1999;73(5):3638-3648. doi:10.1128/jvi.73.5.3638-3648.1999
12. Hilton L, Moganeradj K, Zhang G, et al. The NPro Product of Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits DNA Binding by Interferon Regulatory Factor 3 and Targets It for Proteasomal Degradation. *J Virol.* 2006;80(23):11723-11732. doi:10.1128/jvi.01145-06
 13. Jefferson M, Donaszi-Ivanov A, Pollen S, Dalmay T, Saalbach G, Powell PP. Host Factors That Interact with the Pestivirus N-Terminal Protease, Npro, Are Components of the Ribonucleoprotein Complex. *J Virol.* 2014;88(18):10340-10353. doi:10.1128/jvi.00984-14
 14. Ruggli N, Bird BH, Liu L, Bauhofer O, Tratschin JD, Hofmann MA. Npro of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN- α/β induction. *Virology.* 2005;340(2):265-276. doi:10.1016/J.VIROL.2005.06.033
 15. Griffin SDC, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol.* 2004;85(2):451-461. doi:10.1099/vir.0.19634-0
 16. Harada T, Tautz N, Thiel H-J. E2-p7 Region of the Bovine Viral Diarrhea Virus Polyprotein: Processing and Functional Studies. *J Virol.* 2000;74(20):9498-9506. doi:10.1128/jvi.74.20.9498-9506.2000
 17. Qu L, McMullan LK, Rice CM. Isolation and Characterization of Noncytopathic Pestivirus Mutants Reveals a Role for Nonstructural Protein NS4B in Viral Cytopathogenicity. *J Virol.* 2001;75(22):10651-10662. doi:10.1128/jvi.75.22.10651-10662.2001
 18. Weiskircher E, Aligo J, Ning G, Konan K V. Bovine viral diarrhea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virology.* 2009;6. doi:10.1186/1743-422X-6-185
 19. Chang L, Qi Y, Liu D, Du Q, Zhao X, Tong D. Molecular detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus in Western China. *BMC Vet Res.* 2021;17(1):1-7. doi:10.1186/S12917-021-02747-7/FIGURES/2
 20. Yeşilbağ K, Alpay G, Becher P. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses.* 2017;9(6). doi:10.3390/V9060128
 21. Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FSF, Gil LHV. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 2002;87(1):51-60. doi:10.1016/S0168-1702(02)00080-1
 22. Malacari DA, Pécora A, Pérez Aguirreburualde MS, Cardoso NP, Odeón AC, Capozzo AV. In Vitro and In Vivo Characterization of a Typical and a High Pathogenic Bovine Viral

- Diarrhea Virus Type II Strains. *Front Vet Sci.* 2018;5(APR).
doi:10.3389/FVETS.2018.00075
23. Vilček Š, Greiser-Wilke I, Nettleton P, Paton DJ. Cellular insertions in the NS2-3 genome region of cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates. *Vet Microbiol.* 2000;77(1-2):129-136. doi:10.1016/S0378-1135(00)00269-8
 24. Ridpath JF, Qi F, Bolin SR, Berry ES. Natural recombination in bovine viral diarrhea viruses. *Arch Virol Suppl.* 1994;9:239-244. doi:10.1007/978-3-7091-9326-6_24
 25. Gamlen T, Richards KH, Mankouri J, et al. Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. *J Gen Virol.* 2010;91(1):133-144. doi:10.1099/vir.0.016170-0
 26. Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res.* 2010;41(6). doi:10.1051/vetres/2010016
 27. Bezek DM, Gröhn YT, Dubovi EJ. Effect of acute infection with noncytopathic or cytopathic bovine viral diarrhea virus isolates on bovine platelets. *Am J Vet Res.* 1994;55(8):1115-1119. Accessed April 11, 2022.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7978652/>
 28. Pecora A, Pérez Aguirreburualde MS, Aguirreburualde A, et al. Safety and efficacy of an E2 glycoprotein subunit vaccine produced in mammalian cells to prevent experimental infection with bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Vet Res Commun.* 2012;36(3):157-164. doi:10.1007/S11259-012-9526-X
 29. Spetter MJ, Louge Uriarte EL, Verna AE, et al. Genomic diversity and phylodynamic of bovine viral diarrhea virus in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2021;96:105089. doi:10.1016/J.MEEGID.2021.105089
 30. Iqbal M, Flick-Smith H, Mccauley JW. Printed in Great Britain Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E rns with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol.* 2000;81:451-459.
 31. Krey T, Himmelreich A, Heimann M, Menge C, Thiel H, Maurer K. Function of Bovine CD46 as a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus Is Determined by Complement Control Protein 1. 2006;80(8):3912-3922. doi:10.1128/JVI.80.8.3912
 32. Maurer K, Krey T, Moennig V, Thiel H-J, Rümenapf T. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J Virol.* 2004;78(4):1792-1799. doi:10.1128/JVI.78.4.1792-1799.2004
 33. Alzamel N, Bayrou C, Decreux A, Desmecht D. Soluble forms of CD46 are detected in

- Bos taurus plasma and neutralize BVDV, the bovine pestivirus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2016;49:39-46. doi:10.1016/J.CIMID.2016.09.001
34. Krey T, Moussay E, Thiel H-J, Rumenapf T. Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*. 2006;80(21):10862-10867. doi:10.1128/JVI.01589-06
 35. Agnello V, Ábel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12766-12771. doi:10.1073/PNAS.96.22.12766
 36. Krey T, Thiel H-J, Rumenapf T. Acid-Resistant Bovine Pestivirus Requires Activation for pH-Triggered Fusion during Entry. *J Virol*. 2005;79(7):4191. doi:10.1128/JVI.79.7.4191-4200.2005
 37. Lecot S, Belouzard S, Dubuisson J, Rouillé Y. Bovine Viral Diarrhoea Virus Entry Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol*. 2005;79(16):10826. doi:10.1128/JVI.79.16.10826-10829.2005
 38. El Omari K, Iourin O, Harlos K, Grimes JM, Stuart DI. Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry. *Cell Rep*. 2013;3(1):30-35. doi:10.1016/J.CELREP.2012.12.001
 39. Byk LA, Iglesias NG, De Maio FA, Gebhard LG, Rossi M, Gamarnik A V. Dengue virus genome uncoating requires ubiquitination. *MBio*. 2016;7(3). doi:10.1128/MBIO.00804-16
 40. Murray CL, Marcotrigiano J, Rice CM. Bovine Viral Diarrhoea Virus Core Is an Intrinsically Disordered Protein That Binds RNA. *J Virol*. 2008;82(3):1294. doi:10.1128/JVI.01815-07
 41. Grummer B, Beer M, Liebler-Tenorio E, Greiser-Wilke I. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol*. 2001;82(Pt 11):2597-2605. doi:10.1099/0022-1317-82-11-2597
 42. Khodakaram-Tafti A, Farjanikish GH. Persistent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iran J Vet Res*. Published online 2017. doi:10.22099/ijvr.2017.4190
 43. Hou P, Xu Y, Wang H, He H. Detection of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 in aerosol by a real time RT-PCR assay. *BMC Vet Res*. 2020;16(1). doi:10.1186/S12917-020-02330-6
 44. Givens MD, Heath AM, Brock K V., Brodersen BW, Carson RL, Stringfellow DA. Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *Am J Vet Res*. 2003;64(4):428-434. doi:10.2460/AJVR.2003.64.428
 45. Rikula U, Nuotio L, Laamanen UI, Sihvonen L. Transmission of bovine viral diarrhoea

- virus through the semen of acutely infected bulls under field conditions. *Vet Rec.* 2008;162(3):79-82. doi:10.1136/VR.162.3.79
46. Niskanen R, Alenius S, Belák K, et al. Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod Domest Anim.* 2002;37(3):171-175. doi:10.1046/J.1439-0531.2002.00353.X
 47. Givens MD, Riddell KP, Edmondson MA, et al. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol.* 2009;139(1-2):42-51. doi:10.1016/J.VETMIC.2009.04.029
 48. Knapek KJ, Georges HM, van Campen H, et al. Fetal Lymphoid Organ Immune Responses to Transient and Persistent Infection with Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Viruses.* 2020;12(8). doi:10.3390/V12080816
 49. Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M. BVDV and innate immunity. *Biologicals.* 2003;31(2):107-111. doi:10.1016/S1045-1056(03)00024-1
 50. Wittum TE, Grotelueschen DM, Brock K V., et al. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. *Prev Vet Med.* 2001;49(1-2):83-94. doi:10.1016/S0167-5877(01)00181-7
 51. Brodersen BW. Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Vet Pathol.* 2014;51(2):453-464. doi:10.1177/0300985813520250
 52. Chase CCL. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals.* 2013;41(1):52-60. doi:10.1016/j.biologicals.2012.09.009
 53. Asfor AS, Wakeley PR, Drew TW, Paton DJ. Recombinant pestivirus E2 glycoproteins prevent viral attachment to permissive and non permissive cells with different efficiency. *Virus Res.* 2014;189:147-157. doi:10.1016/J.VIRUSRES.2014.05.016
 54. González Altamiranda EA, Kaiser GG, Weber N, et al. Clinical and reproductive consequences of using BVDV-contaminated semen in artificial insemination in a beef herd in Argentina. *Anim Reprod Sci.* 2012;133(3-4):146-152. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2012.06.022
 55. Niskanen R, Alenius S, Belák K, et al. Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod Domest Anim.* 2002;37(3):171-175. doi:10.1046/j.1439-0531.2002.00353.x
 56. Houe H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995;11(3):521-547. doi:10.1016/S0749-0720(15)30465-5

57. Fredriksen B, Sandvik T, Løken T, Ødegaard SA. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec.* 1999;144(5):111-114. doi:10.1136/VR.144.5.111
58. Scharnböck B, Roch FF, Richter V, et al. A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population. *Sci Reports* 2018 81. 2018;8(1):1-15. doi:10.1038/s41598-018-32831-2
59. Palfi V, Houe H, Philipsen J. Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. *Acta Vet Scand.* 1993;34(1):105-107. doi:10.1186/BF03548231
60. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol.* 1999;64(2-3):89-107. doi:10.1016/S0378-1135(98)00262-4
61. Richter V, Lebl K, Baumgartner W, Obritzhauser W, Käsbohrer A, Pinior B. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet J.* 2017;220:80-87. doi:10.1016/J.TVJL.2017.01.005
62. Pecora A, Sol M, Aguirreburualde P. Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención.
63. Ministerio de Agroindustria - INTA. Prevalencia para el Virus de la Diarrea Viral Bovina en rodeos de cría de la Cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires, en el año 2015. Published online 2015.
64. Spetter MJ, Louge Uriarte EL, Armendano JI, et al. Frequency of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in Argentinean bovine herds and comparison of diagnostic tests for BVDV detection in bovine serum samples: a preliminary study. *Brazilian J Microbiol.* 2021;52(1):467. doi:10.1007/S42770-020-00410-1
65. Speck SH, Ganem D. Viral latency and its regulation: lessons from the gammaherpesviruses. *Cell Host Microbe.* 2010;8(1):100. doi:10.1016/J.CHOM.2010.06.014
66. Zhang G, Aldridge S, Clarke MC, McCauley JW. Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J Gen Virol.* 1996;77 (Pt 8)(8):1677-1681. doi:10.1099/0022-1317-77-8-1677
67. St-Louis MC, Massie B, Archambault D. The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) NS3 protein, when expressed alone in mammalian cells, induces apoptosis which correlates with caspase-8 and caspase-9 activation. *Vet Res.* 2005;36(2):213-227. doi:10.1051/VETRES:2004059
68. Meyers G, Ege A, Fetzer C, et al. Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent

- fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro protease. *J Virol.* 2007;81(7):3327-3338. doi:10.1128/JVI.02372-06
69. Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr B V., Morrison WI. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol.* 2001;82(8):1893-1897. doi:10.1099/0022-1317-82-8-1893
 70. Shoemaker ML, Smirnova NP, Bielefeldt-Ohmann H, et al. Differential expression of the type I interferon pathway during persistent and transient bovine viral diarrhea virus infection. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(1):23-35. doi:10.1089/JIR.2008.0033
 71. Smirnova NP, Webb BT, Bielefeldt-Ohmann H, et al. Development of fetal and placental innate immune responses during establishment of persistent infection with bovine viral diarrhea virus. *Virus Res.* 2012;167(2):329-336. doi:10.1016/J.VIRUSRES.2012.05.018
 72. Smirnova NP, Webb BT, McGill JL, et al. Induction of interferon-gamma and downstream pathways during establishment of fetal persistent infection with bovine viral diarrhea virus. *Virus Res.* 2014;183:95-106. doi:10.1016/j.virusres.2014.02.002
 73. 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. *J Virol.* 2006;80(14):6926-6935. doi:10.1128/JVI.02443-05
 74. Collen T, Morrison WI, Douglas AJ, Paton DJ, Zhang G. Single amino acid differences are sufficient for CD4(+) T-cell recognition of a heterologous virus by cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Virology.* 2000;276(1):70-82. doi:10.1006/VIRO.2000.0523
 75. Neill JD, Newcomer BW, Marley SD, Ridpath JF, Givens MD. Genetic change in the open reading frame of bovine viral diarrhea virus is introduced more rapidly during the establishment of a single persistent infection than from multiple acute infections. *Virus Res.* 2011;158(1-2):140-145. doi:10.1016/J.VIRUSRES.2011.03.024
 76. Collins ME, Desport M, Brownlie J. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. *Virology.* 1999;259(1):85-98. doi:10.1006/VIRO.1999.9697
 77. Fray MD, Supple EA, Morrison WI, Charleston B. Germinal centre localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 7):1669-1673. doi:10.1099/0022-1317-81-7-1669
 78. Brusckhe CJM, Haghparast A, Hoek A, et al. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-

- homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;62(1):37-50.
doi:10.1016/S0165-2427(97)00165-7
79. Schaut RG, Ridpath JF, Sacco RE. Bovine viral diarrhoea virus type 2 impairs macrophage responsiveness to toll-like receptor ligation with the exception of toll-like receptor 7. *PLoS One.* 2016;11(7):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0159491
80. Glew EJ, Carr B V., Brackenbury LS, Hope JC, Charleston B, Howard CJ. Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J Gen Virol.* 2003;84(7):1771-1780. doi:10.1099/vir.0.18964-0
81. Cardoso N, Franco-Mahecha OL, Czepluch W, et al. Bovine Viral Diarrhoea Virus Infects Monocyte-Derived Bovine Dendritic Cells by an E2-Glycoprotein-Mediated Mechanism and Transiently Impairs Antigen Presentation. *Viral Immunol.* 2016;29(7):417-429. doi:10.1089/vim.2016.0047
82. Id LG, Mabbott Id N, Id JW, et al. Foot-and-mouth disease virus localisation on follicular dendritic cells and sustained induction of neutralising antibodies is dependent on binding to complement receptors (CR2/CR1). Nachbagauer R, ed. *PLOS Pathog.* 2022;18(5):e1009942. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1009942
83. Brodersen BW, Kelling CL. Alteration of leukocyte populations in calves concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus. *Viral Immunol.* 1999;12(4):323-334. doi:10.1089/VIM.1999.12.323
84. Teichmann U, Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JE. Ultrastructural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal diseases in calves. *Am J Vet Res.* 2000;61(2):174-182. doi:10.2460/AJVR.2000.61.174
85. Silflow RM, Degel PM, Harmsen AG. Bronchoalveolar immune defense in cattle exposed to primary and secondary challenge with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;103(1-2):129-139. doi:10.1016/J.VETIMM.2004.09.008
86. Howard CJ, Clarke MC, Sopp P, Brownlie J. Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992;32(3-4):303-314. doi:10.1016/0165-2427(92)90052-R
87. Liang R, van den Hurk J V., Landi A, et al. DNA prime protein boost strategies protect cattle from bovine viral diarrhoea virus type 2 challenge. *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 2):453-466. doi:10.1099/VIR.0.83251-0
88. Platt R, Widell PW, Kesl LD, Roth JA. Comparison of humoral and cellular immune responses to a pentavalent modified live virus vaccine in three age groups of calves

- with maternal antibodies, before and after BVDV type 2 challenge. *Vaccine*. 2009;27(33):4508-4519. doi:10.1016/J.VACCINE.2009.05.012
89. Pedrera M, Gómez-Villamandos JC, Romero-Trejejo JL, Risalde MA, Molina V, Sánchez-Cordón PJ. Apoptosis in lymphoid tissues of calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype 1: Activation of effector caspase-3 and role of macrophages. *J Gen Virol*. 2009;90(11):2650-2659. doi:10.1099/vir.0.012021-0
 90. Chase CCL, Chase SK, Fawcett L. Trends in the BVDV serological response in the Upper Midwest. *Biologicals*. 2003;31(2):145-151. doi:10.1016/S1045-1056(03)00032-0
 91. Chamorro MF, Walz PH, Haines DM, et al. Comparison of levels and duration of detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus 1, bovine viral diarrhoea virus 2, bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1, and bovine parainfluenza virus 3 in calves fed maternal colostrum or a . *Can J Vet Res*. 2014;78(2):81-88.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3962282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 92. Laura C Miller YS. Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions. *J Clin Cell Immunol*. 2015;06(02). doi:10.4172/2155-9899.1000311
 93. Italiani P, Boraschi D. New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory. *Immune Netw*. 2015;15(4):167.
doi:10.4110/IN.2015.15.4.167
 94. Nikitina E, Larionova I, Choinzonov E, Kzhyshkowska J. Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9). doi:10.3390/IJMS19092821
 95. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J Clin Invest*. Published online 2012. doi:10.1172/JCI59643
 96. Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*. 2008;181(6):3733-3739. doi:10.4049/JIMMUNOL.181.6.3733
 97. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-6173.
doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
 98. Kalish S, Lyamina S, Manukhina E, Malyshev Y, Raetskaya A, Malyshev I. M3 Macrophages Stop Division of Tumor Cells In Vitro and Extend Survival of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res*. Published online 2017.
doi:10.12659/msmbr.902285
 99. De Sousa JR, Lucena Neto FD, Sotto MN, Quaresma JAS. Immunohistochemical characterization of the M4 macrophage population in leprosy skin lesions. *BMC Infect Dis*. Published online 2018. doi:10.1186/s12879-018-3478-x

100. Williams KC, Kim W-K. Editorial: Identification of in vivo markers for human polarized macrophages: a need that's finally met. *J Leukoc Biol*. Published online 2015. doi:10.1189/jlb.1ce0615-233rr
101. Cumming RI, Yu YRA. Phenotyping tumor-associated macrophages. In: *Methods in Molecular Biology*. ; 2018. doi:10.1007/978-1-4939-7837-3_10
102. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep*. Published online 2014. doi:10.12703/P6-13
103. Nahrendorf M, Swirski FK. Abandoning M1/M2 for a network model of macrophage function. *Circ Res*. Published online 2016. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309194
104. Briken V, Mosser DM. Editorial: Switching on arginase in M2 macrophages. *J Leukoc Biol*. 2011;90(5):839. doi:10.1189/JLB.0411203
105. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol*. 2014;5(OCT):1-10. doi:10.3389/fimmu.2014.00532
106. Yang Z, Ming XF. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: Impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front Immunol*. 2014;5(OCT). doi:10.3389/fimmu.2014.00533
107. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/816460
108. Ma C, Xia Y, Yang Q, Zhao Y. The contribution of macrophages to systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2019;207:1-9. doi:10.1016/J.CLIM.2019.06.009
109. Allavena P, Peccatori F, Maggioni D, et al. Intraperitoneal Recombinant γ -Interferon in Patients with Recurrent Ascitic Ovarian Carcinoma: Modulation of Cytotoxicity and Cytokine Production in Tumor-associated Effectors and of Major Histocompatibility Antigen Expression on Tumor Cells. *Cancer Res*. 1990;50(22):7318-7323. Accessed May 5, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2121337/>
110. Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, et al. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*. 2011;331(6024):1612-1616. doi:10.1126/SCIENCE.1198443
111. Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*. 2004;20(5):623-635. doi:10.1016/S1074-7613(04)00107-4
112. Boeuf P, Drummer HE, Richards JS, Scoullar MJL, Beeson JG. The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms, and impact. *BMC*

- Med.* 2016;14(1). doi:10.1186/S12916-016-0660-0
113. Stevenson E V., Collins-McMillen D, Kim JH, Ciepły SJ, Bentz GL, Yurochko AD. HCMV reprogramming of infected monocyte survival and differentiation: a Goldilocks phenomenon. *Viruses*. 2014;6(2):782-807. doi:10.3390/V6020782
 114. Kosyreva A, Dzhililova D, Lokhonina A, Vishnyakova P, Fatkhudinov T. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of SARS-CoV-2-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front Immunol*. 2021;12:1667. doi:10.3389/FIMMU.2021.682871/BIBTEX
 115. Brown MB, von Chamier M, Allam AB, Reyes L. M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Front Immunol*. 2014;5(NOV):606. doi:10.3389/FIMMU.2014.00606/BIBTEX
 116. Guzman E, Pujol M, Ribeca P, Montoya M. Bovine derived in vitro cultures generate heterogeneous populations of antigen presenting cells. *Front Immunol*. Published online 2019. doi:10.3389/fimmu.2019.00612
 117. Düvel A, Frank C, Schnapper A, Schuberth HJ, Sipka A. Classically or alternatively activated bovine monocyte-derived macrophages in vitro do not resemble CD163/Calprotectin biased macrophage populations in the teat. *Innate Immun*. Published online 2012. doi:10.1177/1753425912446954
 118. Pontzer CH, Russell SW. Culture of macrophages from bovine bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol*. 1989;21(3-4):351-362. doi:10.1016/0165-2427(89)90042-1
 119. Adler H, Jungi TW, Pfister H, Strasser M, Sileghem M, Peterhans E. Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *J Virol*. 1996;70(4):2650-2653. doi:10.1128/jvi.70.4.2650-2653.1996
 120. Adler H, Frech B, Meier P, Jungi TW, Peterhans E. Noncytopathic strains of bovine viral diarrhoea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;202(3):1562-1568. doi:10.1006/bbrc.1994.2109
 121. Magee DA, Conlon KM, Nalpas NC, et al. Innate cytokine profiling of bovine alveolar macrophages reveals commonalities and divergence in the response to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2014;94(4):441-450. doi:10.1016/J.TUBE.2014.04.004
 122. Widdison S, Watson M, Piercy J, Howard C, Coffey TJ. Granulocyte chemotactic properties of *M. tuberculosis* versus *M. bovis*-infected bovine alveolar macrophages. *Mol Immunol*. 2008;45(3):740-749. doi:10.1016/j.molimm.2007.06.357
 123. Adams JL, Czuprynski CJ. Bacterial lipopolysaccharide induces release of tumor necrosis

- factor-alpha from bovine peripheral blood monocytes and alveolar macrophages in vitro. *J Leukoc Biol.* 1990;48(6):549-556. doi:10.1002/JLB.48.6.549
124. Piercy J, Werling D, Coffey TJ. Differential responses of bovine macrophages to infection with bovine-specific and non-bovine specific mycobacteria. *Tuberculosis.* Published online 2007. doi:10.1016/j.tube.2007.06.001
 125. Hussen J, Frank C, Düvel A, Koy M, Schuberth HJ. The chemokine CCL5 induces selective migration of bovine classical monocytes and drives their differentiation into LPS-hyporesponsive macrophages in vitro. *Dev Comp Immunol.* 2014;47(2):169-177. doi:10.1016/j.dci.2014.07.014
 126. Thirunavukkarasu S, De Silva K, Begg DJ, Whittington RJ, Plain KM. Macrophage polarization in cattle experimentally exposed to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Pathog Dis.* Published online 2015. doi:10.1093/femspd/ftv085
 127. Larsson J. Inflammatory cytokines induced by Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) subsets Sveriges Lantbruksuniversitet Inflammatory cytokines induced by Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in Peripheral Blood Mononuc. *Pathology.* Published online 2010.
 128. Corripio-Miyar Y, Hope J, McInnes CJ, et al. Phenotypic and functional analysis of monocyte populations in cattle peripheral blood identifies a subset with high endocytic and allogeneic T-cell stimulatory capacity. *Vet Res.* Published online 2015. doi:10.1186/s13567-015-0246-4
 129. Castillo-Velázquez U, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra R, Tamez-Guerra P, Rodríguez-Padilla C. Differential responses of macrophages from bovines naturally resistant or susceptible to Mycobacterium bovis after classical and alternative activation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;154(1-2):8-16. doi:10.1016/j.vetimm.2013.04.010
 130. Burr S, Thomas C, Brownlie J, Offord V, Coffey TJ, Werling D. Potential evidence for biotype-specific chemokine profile following BVDV infection of bovine macrophages. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;150(1-2):123-127. doi:10.1016/j.vetimm.2012.08.009
 131. Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. Intracellular survival of Brucella abortus, Mycobacterium bovis BCG, Salmonella dublin, and Salmonella typhimurium in macrophages from cattle genetically resistant to Brucella abortus. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;50(1-2):55-65. doi:10.1016/0165-2427(95)05492-8
 132. Hussen J, Düvel A, Sandra O, et al. Phenotypic and Functional Heterogeneity of Bovine Blood Monocytes. *PLoS One.* 2013;8(8):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0071502
 133. Hope JC, Werling D, Collins RA, Mertens B, Howard CJ. Flt-3 ligand, in combination with

- bovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-4, promotes the growth of bovine bone marrow derived dendritic cells. *Scand J Immunol.* 2000;51(1):60-66. doi:10.1046/J.1365-3083.2000.00646.X
134. Werling D, Hope JC, Chaplin P, Collins RA, Taylor G, Howard CJ. Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 1999;66(1):50-58. doi:10.1002/JLB.66.1.50
 135. Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology.* 2004;111(1):41-52. doi:10.1111/J.1365-2567.2004.01781.X
 136. Magee DA, Taraktsoglou M, Killick KE, et al. Global gene expression and systems biology analysis of bovine monocyte-derived macrophages in response to in vitro challenge with *Mycobacterium bovis*. *PLoS One.* 2012;7(2). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0032034
 137. Abdellrazeq GS, Elnaggar MM, Bannantine JP, et al. A *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis relA deletion mutant and a 35 kDa major membrane protein elicit development of cytotoxic T lymphocytes with ability to kill intracellular bacteria. *Vet Res.* 2018;49(1). doi:10.1186/S13567-018-0549-3
 138. Carinne; Chantal , Isabelle; Rodriguez, Valérie; Berthier D. In vitro polarization of bovine macrophages, an optimized protocol. Poster. Published 2016.
<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2016211611>
 139. Imrie H, Williams DJL. Stimulation of bovine monocyte-derived macrophages with lipopolysaccharide, interferon- γ , Interleukin-4 or Interleukin-13 does not induce detectable changes in nitric oxide or arginase activity. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):1-8. doi:10.1186/s12917-019-1785-0
 140. Hussen J, Koy M, Petzl W, Schuberth H-J. Neutrophil degranulation differentially modulates phenotype and function of bovine monocyte subsets.
doi:10.1177/1753425915620911
 141. Jenvey CJ, Shircliff AL, Bannantine JP, Stabel JR. Phenotypes of macrophages present in the intestine are impacted by stage of disease in cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *PLoS One.* 2019;14(5).
doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0217649
 142. Adler B, Adler H, Pfister H, Jungi TW, Peterhans E. Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. *J Virol.* 1997;71(4):3255-3258.
doi:10.1128/jvi.71.4.3255-3258.1997

143. Perler L, Schweizer M, Jungi TW, Peterhans E. Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and -independent pathways. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 4):881-887. doi:10.1099/0022-1317-81-4-881
144. Abdelsalam K, Rajput M, Elmowalid G, et al. The effect of bovine viral diarrhea virus (BVDV) strains and the corresponding infected-macrophages supernatant on macrophage inflammatory function and lymphocyte apoptosis. *Viruses.* 2020;12(7). doi:10.3390/v12070701
145. Burr S, Thomas C, Brownlie J, Offord V, Coffey TJ, Werling D. Potential evidence for biotype-specific chemokine profile following BVDV infection of bovine macrophages. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;150(1-2):123-127. doi:10.1016/J.VETIMM.2012.08.009
146. Morales-Aguilar A, López-Reyes Y, Regalado-Huitrón M, sarmiento-Silva RE, Arriaga-Pizano L, Benitez-Guzman A. The NADL strain of bovine viral diarrhea virus induces the secretion of IL-1 β through caspase 1 in bovine macrophages. *Res Vet Sci.* 2020;131:131-136. doi:10.1016/j.rvsc.2020.04.014
147. Elsheikh AA. EFFECT OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS ON MACROPHAGES FUNCTIONS. *7th Vet Med Zag Conf.* Published online 2004.
148. Franchini M, Schweizer M, Mätzener P, et al. Evidence for dissociation of TLR mRNA expression and TLR agonist-mediated functions in bovine macrophages. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;110(1-2):37-49. doi:10.1016/J.VETIMM.2005.09.002
149. Raya AI, Gomez-Villamandos JC, Sánchez-Cordón PJ, Bautista MJ. Virus Distribution and Role of Thymic Macrophages During Experimental Infection With Noncytopathogenic Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1. *Vet Pathol.* 2012;49(5):811-818. doi:10.1177/0300985811414031
150. Welsh MD, Adair BM, Foster JC. Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;46(3-4):195-210. doi:10.1016/0165-2427(94)05366-Z
151. Meyer C, von Freyburg M, Elbers K, Meyers G. Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J Virol.* 2002;76(16):8494-8503. doi:10.1128/JVI.76.16.8494-8503.2002
152. Pellerin C, Van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology.* 1994;203(2):260-268. doi:10.1006/VIRO.1994.1483
153. Pecora A, Malacari DA, Ridpath JF, et al. First finding of genetic and antigenic diversity

- in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res Vet Sci*. 2014;96(1):204-212.
doi:10.1016/j.rvsc.2013.11.004
154. Jones LR, Zandomeni RO, Weber EL. A long distance RT-PCR able to amplify the Pestivirus genome. *J Virol Methods*. 2006;134(1-2):197-204.
doi:10.1016/J.JVIROMET.2006.01.005
 155. Fray MD, Mann GE, Charleston B. Validation of an Mx/CAT reporter gene assay for the quantification of bovine type-I interferon. *J Immunol Methods*. 2001;249(1-2):235-244.
doi:10.1016/S0022-1759(00)00359-8
 156. François C, Bernard I, Castelain S, et al. Quantification of different human alpha interferon subtypes and pegylated interferon activities by measuring MxA promoter activation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(9):3770-3775.
doi:10.1128/AAC.49.9.3770-3775.2005
 157. Quintana ME, Barone L, Forlenza MB, et al. A direct high-throughput in Cell-ELISA for measuring infectivity of cytopathic and non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus strains applied to the assessment of antiviral activity. *J Virol Methods*. 2018;260.
doi:10.1016/j.jviromet.2018.07.010
 158. Tahoun A, Jensen K, El-Sharkawy H, et al. Inflammasome Activation in Bovine Peripheral Blood-Derived Macrophages Is Associated with Actin Rearrangement. *Anim an Open Access J from MDPI*. 2020;10(4):655. doi:10.3390/ANI10040655
 159. Weiss DJ, Evanson OA, Moritz A, Deng MQ, Abrahamsen MS. Differential Responses of Bovine Macrophages to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium. *Infect Immun*. 2002;70(10):5556.
doi:10.1128/IAI.70.10.5556-5561.2002
 160. Chitko-McKown CG, Bartens MC, Gibson AJ, et al. Development and characterization of a bovine monocyte-derived macrophage cell line. *J Immunol*. 2018;200(1 Supplement).
 161. Odeón AC, Leunda MR, Faverín C, Boynak N, Vena MM, Zabal O. In vitro amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: Effect of cell line and culture conditions. *Rev Argent Microbiol*. 2009;41(2):79-85.
 162. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec*. 1984;114(22):535-536. doi:10.1136/vr.114.22.535
 163. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol*. 1938;27(3):493-497. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A118408/2/27-3-493.PDF.GIF
 164. Vilček S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using

- polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*. 1994;136(3-4):309-323. doi:10.1007/BF01321060
165. Hyndman L, Vilcek S, Conner J, Nettleton PF. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *J Virol Methods*. 1998;71(1):69-76. doi:10.1016/S0166-0934(97)00206-1
166. Kugel D, Pulverer JE, Köster M, Hauser H, Staeheli P. Novel nonviral bioassays for mouse type I and Type III interferon. *J Interf Cytokine Res*. 2011;31(4):345-349. doi:10.1089/jir.2010.0079
167. Merwaiss F, Pascual MJ, Pomilio MT, Lopez MG, Taboga OA, Alvarez DE. A β -Hairpin Motif in the Envelope Protein E2 Mediates Receptor Binding of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*. 2021;13(6). doi:10.3390/V13061157
168. Franco Mahecha OL, Ogas Castells ML, Combessies G, et al. Single dilution Avidity-Blocking ELISA as an alternative to the Bovine Viral Diarrhea Virus neutralization test. *J Virol Methods*. 2011;175(2):228-235. doi:10.1016/J.JVIROMET.2011.05.022
169. Meyer M, Huaux F, Gavilanes X, et al. Azithromycin reduces exaggerated cytokine production by M1 alveolar macrophages in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(5):590-602. doi:10.1165/rcmb.2008-0155OC
170. Amantea D, Certo M, Petrelli F, et al. Azithromycin protects mice against ischemic stroke injury by promoting macrophage transition towards M2 phenotype. *Exp Neurol*. 2016;275:116-125. doi:10.1016/j.expneurol.2015.10.012
171. Zhang B, Bailey WM, Kopper TJ, Orr MB, Feola DJ, Gensel JC. Azithromycin drives alternative macrophage activation and improves recovery and tissue sparing in contusion spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):1-13. doi:10.1186/S12974-015-0440-3/FIGURES/4
172. Feola DJ, Garvy BA, Cory TJ, et al. Azithromycin alters macrophage phenotype and pulmonary compartmentalization during lung infection with *Pseudomonas*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2437-2447. doi:10.1128/AAC.01424-09/FORMAT/EPUB
173. Haydar D, Cory TJ, Birket SE, et al. Azithromycin Polarizes Macrophages to an M2 Phenotype via Inhibition of the STAT1 and NF- κ B Signaling Pathways. *J Immunol*. 2019;203(4):1021-1030. doi:10.4049/JIMMUNOL.1801228
174. Hodge S, Hodge G, Jersmann H, et al. Azithromycin improves macrophage phagocytic function and expression of mannose receptor in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(2):139-148. doi:10.1164/rccm.200711-1666OC
175. Quintana ME, Barone LJ, Trotta MV, et al. In-vivo Activity of IFN- λ and IFN- α Against Bovine-Viral-Diarrhea Virus in a Mouse Model. *Front Vet Sci*. 2020;7.

doi:10.3389/FVETS.2020.00045

176. Turic E. Farmacocinetica De Azitromicina En Vacas Lecheras Holando Argentino. 2010;1:160.
177. Tierens KFMJ, Thomma BPHJ, Brouwer M, et al. Study of the Role of Antimicrobial Glucosinolate-Derived Isothiocyanates in Resistance of Arabidopsis to Microbial Pathogens. *Plant Physiol.* 2001;125(4):1688. doi:10.1104/PP.125.4.1688
178. Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS, Yurochko AD, Ryman KD. DC-SIGN and L-SIGN Can Act as Attachment Receptors for Alphaviruses and Distinguish between Mosquito Cell- and Mammalian Cell-Derived Viruses. *J Virol.* 2003;77(22):12022. doi:10.1128/JVI.77.22.12022-12032.2003
179. Liu P, Ridilla M, Patel P, et al. Beyond attachment: roles of DC-SIGN in dengue virus infection. *Traffic.* 2017;18(4):218. doi:10.1111/TRA.12469
180. Jaggi U, Yang M, Matundan HH, et al. Increased phagocytosis in the presence of enhanced M2-like macrophage responses correlates with increased primary and latent HSV-1 infection. *PLOS Pathog.* 2020;16(10):e1008971. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1008971
181. Schulz D, Severin Y, Zanotelli VRT, Bodenmiller B. In-Depth Characterization of Monocyte-Derived Macrophages using a Mass Cytometry-Based Phagocytosis Assay. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-38127-9
182. Bosnar M, Čužić S, Bošnjak B, et al. Azithromycin inhibits macrophage interleukin-1 β production through inhibition of activator protein-1 in lipopolysaccharide-induced murine pulmonary neutrophilia ☆. *Int Immunopharmacol.* 2011;11:424-434. doi:10.1016/j.intimp.2010.12.010
183. Bosnar M, Bošnjak B, Čužić S, et al. Azithromycin and Clarithromycin Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Murine Pulmonary Neutrophilia Mainly through Effects on Macrophage-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-1 β . *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;331(1):104-113. doi:10.1124/JPET.109.155838
184. Wang J, Xie L, Wang S, Lin J, Liang J, Xu J. Azithromycin promotes alternatively activated macrophage phenotype in systematic lupus erythematosus via PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Death Dis.* 2018;9(11). doi:10.1038/s41419-018-1097-5
185. Seong G, Oem JK, Lee KH, Choi KS. Experimental infection of mice with bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol 2015 1606.* 2015;160(6):1565-1571. doi:10.1007/S00705-015-2412-4
186. Seong G, Lee JS, Lee KH, Shin SU, Yoon JY, Choi KS. Noncytopathic bovine viral diarrhea

- virus 2 impairs virus control in a mouse model. *Arch Virol.* 2016;161(2):395-403.
doi:10.1007/S00705-015-2665-Y
187. Seong G, Lee JS, Lee KH, Choi KS. Experimental infection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus in mice induces megakaryopoiesis in the spleen and bone marrow. *Arch Virol.* 2016;161(2):417-424. doi:10.1007/S00705-015-2649-Y
 188. Han YJ, Kwon YJ, Lee KH, Choi EJ, Choi KS. Experimental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus 1 in mice induces inflammatory cell infiltration in the spleen. *Arch Virol.* 2016;161(9):2527-2535. doi:10.1007/s00705-016-2952-2
 189. Lee KH, Han DG, Kim S, Choi EJ, Choi KS. Experimental infection of mice with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus 2 increases the number of megakaryocytes in bone marrow. *Virol J.* 2018;15(1). doi:10.1186/S12985-018-1030-7
 190. Liu Y, Wu C, Chen N, et al. PD-1 Blockade Restores the Proliferation of Peripheral Blood Lymphocyte and Inhibits Lymphocyte Apoptosis in a BALB/c Mouse Model of CP BVDV Acute Infection. *Front Immunol.* 2021;12:3616.
doi:10.3389/FIMMU.2021.727254/BIBTEX
 191. Kaya S, Kaçar C, Öğün M, et al. Evaluation of Serum C-Reactive Protein and Natural Antibodies in Cows with Endometritis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2016;22(5):709-715.
doi:10.9775/KVFD.2016.15226
 192. Lic. Bioquímica Susana B. Cseh. Valores de referencia de química sanguínea de bovinos. *INTA Balcarce.* Published online 2013.
 193. Gibson A, Larsson J, Bateman M, Brownlie J, Werling D. Bovine Viral Diarrhoea Virus Strain- and Cell Type-Specific Inhibition of Type I Interferon Pathways. *J Virol.* 2011;85(7):3695. doi:10.1128/JVI.02626-10
 194. Sopp P, Hooper LB, Clarke MC, Howard CJ, Brownlie J. Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. *J Gen Virol.* 1994;75 (Pt 5)(5):1189-1194. doi:10.1099/0022-1317-75-5-1189
 195. Ketelsen AT, Johnson DW, Muscoplat CC. Depression of bovine monocyte chemotactic responses by bovine viral diarrhoea virus. *Infect Immun.* 1979;25(2):565-568.
doi:10.1128/IAI.25.2.565-568.1979
 196. Roth JA. Lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus Pathogenesis of *Mycoplasma hyopneumoniae* View project. Accessed June 29, 2022.
<https://www.researchgate.net/publication/19443675>
 197. Thakur N, Evans H, Abdelsalam K, et al. Bovine viral diarrhoea virus compromises Neutrophil's functions in strain dependent manner. *Microb Pathog.* 2020;149.

- doi:10.1016/J.MICPATH.2020.104515
198. Bielefeldt Ohmann H. In situ characterization of mononuclear leukocytes in skin and digestive tract of persistently bovine viral diarrhoea virus-infected clinically healthy calves and calves with mucosal disease. *Vet Pathol.* 1988;25(4):304-309.
doi:10.1177/030098588802500409
 199. Lambot M, Hanon E, Lecomte C, Hamers C, Letesson JJ, Pastoret PP. Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol.* 1998;79 (Pt 7)(7):1745-1749. doi:10.1099/0022-1317-79-7-1745
 200. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest.* 2004;16(5):388-396.
doi:10.1177/104063870401600504
 201. Quintana ME, Cardoso NP, Pereyra R, et al. Interferon lambda protects cattle against bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2020;230.
doi:10.1016/j.vetimm.2020.110145
 202. Apelbaum A, Yarden G, Warszawski S, Harari D, Schreiber G. Type I Interferons Induce Apoptosis by Balancing cFLIP and Caspase-8 Independent of Death Ligands. *Mol Cell Biol.* 2013;33(4):800. doi:10.1128/MCB.01430-12
 203. Li W, Lewis-Antes A, Huang J, Balan M, Kotenko S V. Regulation of apoptosis by type III interferons. *Cell Prolif.* 2008;41(6):960-979. doi:10.1111/J.1365-2184.2008.00558.X
 204. De Saint Jean M, Brignole F, Feldmann G, Goguel A, Baudouin C. Interferon- γ induces apoptosis and expression of inflammation-related proteins in Chang conjunctival cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(10):2199-2212.
 205. Naessens J, Newson J, McHugh N, Howard CJ, Parsons K, Jones B. Characterization of a bovine leucocyte differentiation antigen of 145,000 MW restricted to B lymphocytes. *Immunology.* 1990;69(4):525. Accessed June 20, 2022.
[/pmc/articles/PMC1385623/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1385623/)
 206. Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(6):457-464. doi:10.1038/NRI1859
 207. Bastos RG, Sears K, Dinkel KD, Knowles DP, Fry LM. Changes in the Molecular and Functional Phenotype of Bovine Monocytes during *Theileria parva* Infection. *Infect Immun.* 2019;87(12). doi:10.1128/IAI.00703-19
 208. Depreester E, Meyer E, Demeyere K, Van Eetvelde M, Hostens M, Opsomer G. Flow cytometric assessment of myeloperoxidase in bovine blood neutrophils and monocytes.

- J Dairy Sci.* 2017;100(9):7638-7647. doi:10.3168/JDS.2016-12186
209. Falkenberg SM, Dassanayake RP, Walz P, Casas E, Neill JD, Ridpath JF. Frequency of bovine viral diarrhoea virus detected in subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in persistently infected animals and health outcome. *Vet Immunol Immunopathol.* 2019;207:46-52. doi:10.1016/J.VETIMM.2018.11.015
 210. Marzocca MP, Seki C, Giambiagi SM, et al. Truncated E2 of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Drosophila melanogaster* cells: a candidate antigen for a BVDV ELISA. *J Virol Methods.* 2007;144(1-2):49-56. doi:10.1016/J.JVIROMET.2007.03.023
 211. Li Y, Hao B, Kuai X, et al. C-type lectin LSECtin interacts with DC-SIGNR and is involved in hepatitis C virus binding. *Mol Cell Biochem.* 2009;327(1):183. doi:10.1007/S11010-009-0056-Y
 212. Martinez P, Denys A, Delos M, et al. Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology.* 2015;25(5):502-513. doi:10.1093/GLYCOB/CWU137
 213. Hulst MM, Moormann RJM. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol.* 1997;78 (Pt 11)(11):2779-2787. doi:10.1099/0022-1317-78-11-2779
 214. Clasper S, Vekemans S, Fiore M, et al. Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action. *J Biol Chem.* 1999;274(34):24113-24123. doi:10.1074/JBC.274.34.24113
 215. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity.* 2019;50(4):907-923. doi:10.1016/J.IMMUNI.2019.03.025
 216. Kim OH, Kim H, Kang J, et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cells causes accumulation of bone marrow-derived macrophages in aged mice. *BMB Rep.* Published online 2017. doi:10.5483/BMBRep.2017.50.1.167
 217. García-Nicolás O, Baumann A, Vielle NJ, et al. Virulence and genotype-associated infectivity of interferon-treated macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Virus Res.* 2014;179(1):204-211. doi:10.1016/j.virusres.2013.08.009
 218. Da Silva TA, Zorzetto-Fernandes ALV, Cecílio NT, Sardinha-Silva A, Fernandes FF, Roque-Barreira MC. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/S41598-017-07397-0
 219. Hayes BH, Tsai RK, Dooling LJ, et al. Macrophages show higher levels of engulfment after disruption of cis interactions between CD47 and the checkpoint receptor SIRP α . *J*

- Cell Sci.* 2020;133(5). doi:10.1242/JCS.237800
220. Gautam PK, Acharya A. Suppressed expression of homotypic multinucleation, extracellular domains of CD172 α (SIRP- α) and CD47 (IAP) receptors in TAMs upregulated by Hsp70-peptide complex in Dalton's lymphoma. *Scand J Immunol.* 2014;80(1):22-35. doi:10.1111/SJI.12180
 221. Luque-Campos N, Bustamante-Barrientos FA, Pradenas C, et al. The Macrophage Response Is Driven by Mesenchymal Stem Cell-Mediated Metabolic Reprogramming. *Front Immunol.* 2021;12:2064. doi:10.3389/FIMMU.2021.624746/BIBTEX
 222. Bertani FR, Mozetic P, Fioramonti M, et al. Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/S41598-017-08121-8
 223. Trombetta AC, Soldano S, Contini P, et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir Res.* 2018;19(1). doi:10.1186/S12931-018-0891-Z
 224. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM, Aparicio Alonso P. Roitt. *Inmunología. Fundamentos (11a edición).* *Inmunología.* 2008;27(4):212-214. doi:10.1016/S0213-9626(08)70069-6
 225. Donnelly RP, Kotenko S V. Interferon-Lambda: A New Addition to an Old Family. *J Interf Cytokine Res.* 2010;30(8):555-564. doi:10.1089/jir.2010.0078
 226. Read SA, Wijaya R, Ramezani-Moghadam M, et al. Macrophage Coordination of the Interferon Lambda Immune Response. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/FIMMU.2019.02674/FULL
 227. Han S, Zhuang H, Lee PY, et al. Differential Responsiveness of Monocyte and Macrophage Subsets to Interferon. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ).* 2020;72(1):100-113. doi:10.1002/ART.41072
 228. T. Moraes. Arginase in viral respiratory infections.pdf. *Open Nitric Oxide J.* Published online 2010.
 229. Zaffuto KM, Piccone ME, Burrage TG, et al. Classical swine fever virus inhibits nitric oxide production in infected macrophages. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 11):3007-3012. doi:10.1099/VIR.0.83042-0
 230. Delirez N, Shojaeefar E, Parvin P, Asadi B. Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. *Cell J.* 2013;15(3):218-223.
 231. Elkord E, Williams PE, Kynaston H, Rowbottom AW. Human monocyte isolation

- methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*. 2005;114(2):204-212. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.02076.x
232. Nielsen MC, Andersen MN, Møller HJ. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro. *Immunology*. 2020;159(1):63. doi:10.1111/IMM.13125
233. Fensterheim BA, Guo Y, Sherwood ER, Bohannon JK. The Cytokine Response to Lipopolysaccharide Does Not Predict the Host Response to Infection. *J Immunol*. 2017;198(8):3264-3273. doi:10.4049/jimmunol.1602106
234. Widdrington JD, Gomez-Duran A, Pyle A, et al. Exposure of Monocytic Cells to Lipopolysaccharide Induces Coordinated Endotoxin Tolerance, Mitochondrial Biogenesis, Mitophagy, and Antioxidant Defenses. *Front Immunol*. 2018;9:2217. doi:10.3389/fimmu.2018.02217
235. Han DG, Ryu JH, Park J, Choi KS. Identification of a new bovine viral diarrhea virus subtype in the Republic of Korea. *BMC Vet Res*. 2018;14(1). doi:10.1186/S12917-018-1555-4
236. Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT, et al. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can J Vet Res*. 2002;66(3):181. Accessed July 18, 2022. /pmc/articles/PMC227002/
237. Wildfeuer A, Laufen H, Zimmermann T. Uptake of azithromycin by various cells and its intracellular activity under in vivo conditions. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(1):75-79. doi:10.1128/AAC.40.1.75
238. Lucas MF, Errecalde JO, Mestorino N. Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Vet Pharmacol Ther*. 2010;33(2):132-140. doi:10.1111/j.1365-2885.2009.01128.x
239. Cárceles CM, Font A, Escudero E, Espuny A, Marín P, Fernández-Varón E. Pharmacokinetics of azithromycin after i.v. and i.m. administration to sheep. *J Vet Pharmacol Ther*. 2005;28(5):475-479. doi:10.1111/J.1365-2885.2005.00680.X
240. HUNTER RP, LYNCH MJ, ERICSON JF, et al. Pharmacokinetics, oral bioavailability and tissue distribution of azithromycin in cats. *J Vet Pharmacol Ther*. 1995;18(1):38-46. doi:10.1111/j.1365-2885.1995.tb00549.x
241. Dolezelova E, Prasnicka A, Cermanova J, et al. Resveratrol modifies biliary secretion of cholephilic compounds in sham-operated and cholestatic rats. *World J Gastroenterol*. 2017;23(43):7678-7692. doi:10.3748/wjg.v23.i43.7678
242. Fuksa L, Brcakova E, Cermanova J, et al. Amiodarone modulates pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rats. *Biopharm Drug Dispos*. 2008;29(5):289-299.

doi:10.1002/bdd.614

243. Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD, et al. Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*. 2014;345(6204):1251086. doi:10.1126/SCIENCE.1251086