



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Tesis para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

**ACTIVIDAD DEL INTERFERÓN DE TIPO III CONTRA  
EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA**

**Vet. María Eugenia Quintana**

**Directora de Tesis: Dra. Alejandra Victoria Capozzo**

**Instituto de Virología “Scholen Rivenson” – CICVyA – INTA**

**2018**

Tesis doctoral de

Maria Eugenia Quintana

Para optar al grado de Doctor

Por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA

Buenos Aires, 2018

El presente trabajo de Tesis Doctoral titulado “Actividad del Interferón de Tipo III contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina”, fue realizado en el Instituto de Virología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, bajo la Dirección de la Dra. Alejandra Victoria Capozzo.

Vet. Maria Eugenia Quintana

Dra. Alejandra Victoria Capozzo

**Los resultados parciales de esta tesis fueron publicados en el siguiente trabajo:**

**A direct high-throughput in Cell-ELISA for measuring infectivity of cytophatic and non-cytophatic viral strains applied to the assessment of antiviral activity**

María Eugenia Quintana, Nancy Cardoso, Cecilia Turco, Florencia Mansilla, Lucas Barone, María Belén Forlenza, Myrian Trotta y Alejandra Capozzo.

J Virol Methods. 2018 Oct;260:75-81. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.07.010. Epub 2018 Jul 19.

---

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora Alejandra Capozzo, por haber estado siempre al “pie del cañón” y al “pie de la compu”. Gracias por haber confiado en mi y por haberme acompañado durante todo este proceso.

A mis compañeros de laboratorio: Nan, Ceci, Flor, Luqui, Rodri y Myr. Sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible.

Al equipo del Lab F: Mariano, Barrionuevo, Danail, Digi, Andre y Juan Schammas. Gracias por toda su ayuda.

Al Instituto de Virología del INTA: mis compañeros de locutorio, al sector de cultivo de células, a Fatima y Gabriel del bioterio y a Diego, Claudio y Vero del campo experimental.

Gracias a las vacas, terneros y ratones.

A mi abuela, primos y tíos. Muy especialmente a mi tía Irene que me incentivó a salir de la clínica y dar estos primeros pasos en el mundo de la ciencia.

A mis amigas, a las que siempre están y supieron comprender faltazos a reuniones o asados.

A mis hermanos, Sebi y Juanma, que aunque todavía no saben muy bien a que me dedico no dudan en darme aliento para lograr mis objetivos.

A mis Cicheros: Agus, Delfi y Germi. Por su enorme paciencia, comprensión y preocupación. Ger, gracias por ESTAR. Por tus mates, tus cafes, tus tuppens... y por las eternas charlas a la madrugada acerca de virus e interferones. Gracias por hacer que todo sea más fácil.

Finalmente, ¡GRACIAS a mis viejos! Gracias por su apoyo incondicional. Gran parte de lo que soy es gracias a ellos.

AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE.....	5
RESUMEN .....	10
ABSTRACT.....	13
TABLA DE ABREVIATURAS .....	16
INTRODUCCIÓN .....	19
ETIOLOGÍA.....	19
historia de la enfermedad .....	19
morfología y estructura viral.....	19
proteínas virales.....	20
PROTEÍNAS ESTRUCTURALES .....	20
proteínas no estructurales .....	21
genotipos y biotipos virales.....	21
patogenia y manifestaciones clínicas.....	22
infección aguda .....	24
infección congénita .....	24
infección persistente.....	25
enfermedad de las mucosas.....	26
infecciones venéreas.....	26
situación de la enfermedad a nivel mundial .....	26
impacto ECONÓMICO de la enfermedad.....	27
situación de la enfermedad en la argentina .....	28
diagnóstico .....	28
detección directa.....	28
detección indirecta.....	29
profilaxis y tratamiento .....	30
detección y eliminación de animales pi .....	30
vacunas.....	30

interferones.....	31
INTERFERONES DE TIPO I .....	32
INTERFERON DE TIPO II .....	32
INTERFERONES DE TIPO III .....	33
INTERFERONes DE TIPO III:.....	34
SU USO COMO ANTIVIRAL e INMUNOMODULADOR.....	34
expresión de interferones recombinantes.....	35
uso de interferones en animales de producción.....	37
antivirales contra el vdvb .....	38
antivirales como herramientas para disminuir la aplicación de antibióticos en sistemas productivos.....	39
HIPÓTESIS .....	40
OBJETIVOS .....	40
OBJETIVO GENERAL.....	40
OBJETIVOS PARTICULARES .....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
CÉLULAS Y CULTIVOS CELULARES.....	41
virus.....	41
anticuerpos.....	42
animales .....	42
extracción de arn genómico.....	42
diseño de los cebadores.....	43
reacción de retro-transcripción (rt) y pcr para la obtención de los orf para los ifn bovinos .....	43
RT-qPCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE GENOMA VIRAL.....	43
reacción de retro-transcripción (rt) para la detección del 5´utr de pestivirus .....	44
nested-pcr para la detección del 5´utr de pestivirus .....	44
clonado de las secuencias codificantes para los interferones .....	45
expresión de los interferones recombinantes .....	47
page-western blot .....	48
cuantificación de los interferones recombinantes.....	48
preparación de stocks virales.....	49
inmunofluorescencia directa .....	50

ensayo de reducción de formación de placas .....	50
ENSAYO DE TIEMPO DE ADICIÓN .....	50
ensayos de viabilidad celular .....	51
Estudio de viabilidad por cristal violeta .....	51
Estudio de actividad metabólica por XTT .....	52
Cálculo de porcentaje de citotoxicidad .....	52
determinación de apoptosis/necrosis en cmsp .....	52
elisa en células .....	53
infecciOnes con vdvb-gfp .....	53
pre-tratamiento con interferones e infección de cmsp .....	54
puesta a punto modelo murino de infección por vdvb.....	54
Preparación de stocks virales para la infección .....	54
Diseño experimental .....	54
.....	55
Infección de esplenocitos de ratón .....	55
prueba de eficacia en ratones.....	55
Diseño experimental .....	56
AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE ÓRGANOS .....	57
prueba de eficacia en ratones – tratamiento combinado .....	58
.....	59
prueba de seguridad posológica en bovinos.....	59
prueba de eficacia en bovinos.....	60
INSTALACIONES .....	61
ALIMENTACIÓN .....	61
INFECCIÓN EXPERIMENTAL .....	62
SEMIOLOGÍA DEL TERNERO INFECTADO, SCORE CLÍNICO (SC) Y TOMA DE MUESTRAS.....	63
AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE HISOPADO NASAL.....	64
análisis de datos .....	64
RESULTADOS - CAPÍTULO 1 .....	66
OBJETIVOS .....	66
INTRODUCCIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	66
RESULTADOS .....	66

CLONADO DE LOS ORF DE LOS INTERFERONES $\alpha$ y $\lambda 3$ BOVINOS Y VERIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS .....	66
EXPRESIÓN DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES BOVINOS .....	71
EVALUACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES .....	71
EFFECTO DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.....	72
ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES: UNIDADES FORMADORAS DE PLACA.....	74
CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES ACTIVAS DE INTERFERON.....	76
SENSIBILIDAD DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES CONTRA EL VFA Y EL VDV-B-CEPA SINGER.....	76
.....	77
ENSAYO DE TIEMPO DE ADICIÓN .....	77
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES EN CÉLULAS MDBK-t2.....	78
EFFECTO DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.....	79
.....	80
RESUMEN .....	81
RESULTADOS - CAPITULO 2 .....	82
OBJETIVOS.....	82
INTRODUCCIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	82
RESULTADOS .....	83
ELISA EN CÉLULAS.....	83
PUESTA A PUNTO DEL ELISA EN CÉLULAS .....	83
APLICACIÓN DEL ELISA EN CÉLULAS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE OTROS ANTIVIRALES.....	86
CORRELACIÓN ENTRE EL ELISA EN CÉLULAS Y LOS MÉTODOS UTILIZADOS ACTUALMENTE ....	87
RESUMEN .....	88
RESULTADOS – CAPÍTULO 3 .....	90
OBJETIVOS.....	90
INTRODUCCIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	90
RESULTADOS .....	90
DESARROLLO DEL MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR EL VDV-B .....	90
EVALUACIÓN DEL EFFECTO DE LOS IFN- $\alpha$ Y $\lambda$ EN LA PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN CON LA CEPA DE CAMPO 98-124 .....	94



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS IFN- $\alpha$ Y $\lambda$ UTILIZADOS SOLOS O COMBINADOS EN LA PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN CON LA CEPA DE CAMPO 98-124 .....	96
EFFECTO EN LA REDUCCIÓN DE LA VIREMIA .....	97
PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS .....	101
RESUMEN .....	102
RESULTADOS - CAPITULO 4 .....	103
OBJETIVOS .....	103
INTRODUCCIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	103
RESULTADOS .....	104
EVALUACIÓN DE APOPTOSIS EN CMSP TRATADAS CON AMBOS INTERFERONES RECOMBINANTES E INFECTADOS CON EL VDVB .....	104
EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO DE CMSP CON INTERFERONES RECOMBINANTES FRENTE A LA INFECCIÓN CON EL VDVB .....	105
PRUEBA DE SEGURIDAD DE DOSIS DEL INTERFERÓN $\lambda$ 3 RECOMBINANTE EN BOVINOS.....	106
PRUEBA DE EFICACIA DEL INTERFERON $\lambda$ 3 RECOMBINANTE EN BOVINOS .....	107
SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA.....	108
VIREMIA.....	109
EXCRECIÓN VIRAL.....	110
PRODUCCIÓN ANTICUERPOS CONTRA EL VDVB y DE CITOQUINAS PRO Y ANTI-INFLAMATORIAS.....	112
RESUMEN .....	113
DISCUSIÓN.....	115
PRODUCCIÓN DE LOS IFN RECOMBINANTES BOVINOS .....	116
Evaluación de la actividad antiviral de los IFN RECOMBINANTES sobre el VDVB y desarrollo del ELISA en células.....	119
EVALUACIÓN DE LOS IFN RECOMBINANTES CONTRA EL VDVB EN UN MODELO MURINO.....	120
Establecimiento del modelo ratón de infección por el VDVB.....	120
Aplicación del modelo ratón para evaluar la factibilidad del tratamiento antiviral con IFN- $\lambda$ contra el VDVB .....	122
Aplicación del IFN- $\lambda$ RECOMBINANTE en bovinos.....	125
CONCLUSIONES .....	129
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	130

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) representa un importante desafío a nivel productivo debido a su carácter endémico a nivel mundial. La infección por el VDVB es altamente prevalente en la Argentina y provoca pérdidas económicas para la industria lechera y ganadera, asociadas mayormente a problemas reproductivos. La enfermedad provocada por el VDVB se presenta con una variada signología que puede ir desde un curso subclínico a cuadros agudos hemorrágicos cuyo desenlace suele ser fatal. A esto se suma el efecto inmunosupresor del VDVB que predispone a infecciones bacterianas y parasitarias que pueden comprometer la vida del animal.

El VDVB pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus* y está representado por 3 genotipos: VDVB-1, VDVB-2 y VDVB-3 o “Virus HoBi-like”. A su vez, este agente puede ser clasificado según su biotipo en citopático (CP) y no citopático (NCP). Una característica fundamental del VDVB es su capacidad de generar infecciones persistentes. El nacimiento de animales persistentemente infectados (PI) tiene lugar cuando las hembras preñadas se infectan con una cepa NCP del VDVB entre los días 30 y 150 de gestación. Estos individuos no son capaces de montar una respuesta inmune y eliminan grandes cantidades de virus en todas las excreciones y secreciones. Actualmente se proponen dos medidas principales para el control de la enfermedad: la detección y eliminación de animales PI, y la posterior vacunación de todo el rodeo no PI. La primera medida es recibida con fuerte resistencia por parte de los productores. Por otro lado, la inmunidad que confieren las vacunas que se encuentran en el mercado requiere más de dos semanas para desarrollarse e incluso de más de una dosis, siendo dudosa su eficacia en presencia de inmunidad materna. A estos inconvenientes se suma que la mayoría de las formulaciones comerciales no brindan cobertura contra todas las cepas del virus que circulan en el campo.

Para complementar el conjunto de herramientas para el control del VDVB se precisan antivirales que puedan prevenir la dispersión viral y evitar la inmunosupresión. Los antivirales podrían utilizarse en casos de brotes o como preventivo antes de ciertas maniobras como el transporte, encierro, inseminaciones, introducción de nuevos animales, etc. En este trabajo proponemos el uso de Interferones (IFNs) ya que son antivirales naturales, de sencilla producción y amplio espectro. En contraste con la respuesta inmune adaptativa, los mecanismos innatos de defensa inmune mediados por los IFNs son inmediatos, y resultan operativos incluso en las primeras etapas de desarrollo intrauterino. La administración de IFNs como agentes bioterapéuticos es una medida efectiva para el tratamiento de varias infecciones virales. Tradicionalmente, en terapias desarrolladas para humanos, se ha utilizado el IFN de tipo I (IFN- $\alpha$ ). Este está siendo actualmente reemplazado, dada su toxicidad hematológica, por el IFN de tipo III (IFN- $\lambda$ ). El efecto antiviral de esta última citoquina es idéntico al del IFN- $\alpha$  pero localizado en epitelios, principalmente en mucosas, sin efecto sobre las células sanguíneas. La familia del IFN- $\lambda$  se encuentra conservada en bovinos y el tratamiento con IFN- $\lambda$ 3 ha mostrado ser eficaz en controlar la infección oronasal por el virus de la fiebre aftosa (VFA). No se ha estudiado la aplicación terapéutica ni la funcionalidad del IFN- $\lambda$ 3 contra otros virus que afectan la producción ganadera.

Este trabajo plantea las siguientes hipótesis: “*El IFN- $\lambda$ 3 bovino posee actividad antiviral contra el VDVB*”; y “*El IFN- $\lambda$ 3 bovino recombinante es un candidato para ser utilizado como bioterapéutico en infecciones con el VDVB*”. Para contrastar estas hipótesis, hemos clonado y expresado el IFN- $\lambda$ 3 y el IFN- $\alpha$  bovinos en células de mamífero en cultivo y evaluamos su actividad antiviral frente a distintas cepas del VDVB tanto *in vitro* como *in vivo* para comprobar su potencial uso como bioterapéutico en bovinos.

Los IFN recombinantes (IFNr) producidos en sobrenadantes de células HEK293T transfectadas fueron cuantificados en función a las unidades activas determinadas sobre un virus de referencia y utilizando un ensayo reportero de actividad basado en células de riñón bovino Madin-Darby T2 (MDBK-T2) transfectadas en forma estable con el promotor del gen Mx río arriba del ORF para la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Para establecer la sensibilidad de cepas de campo y de referencia del VDVB a los IFNr, desarrollamos una técnica de alto rendimiento aplicable a cepas CP y NPC. Se trata de un ELISA en células que permite la medición directa de la infección detectando una proteína no estructural del virus en microplacas de cultivo celular, sin necesidad de cosechar las células. Utilizando este ensayo estimamos la concentración inhibitoria 50% para cada IFNr utilizando seis cepas de VDVB de diferente biotipo y genotipo, verificando que las cepas CP son más susceptibles a ambos IFNr que las NCP y, particularmente, las cepas NCP de tipo 2 resultaron más sensibles al IFN- $\lambda$ .

La actividad de los IFNr fue evaluada luego *in vivo*, en un modelo murino de virulencia desarrollado en nuestro laboratorio, en el que ratones de la cepa BALB/c infectados con cepas del tipo 2 del VDVB desarrollan viremia a los 4 ó 7 días post infección (dpi), según la virulencia de la cepa. La cepa de alta virulencia suprimió además la respuesta pro-inflamatoria en estos animales. A juzgar por nuestros resultados, el tratamiento de los ratones infectados con la cepa 98-124 (de baja virulencia) con IFNr murinos comerciales mostró que el IFN- $\lambda$  fue más eficiente en prevenir la infección mientras que el IFN- $\alpha$  evitó la viremia. Experimentos de tratamiento combinado con dos dosis de IFN pre y post infección, combinando el uso de ambos IFNs, reveló que el tratamiento con IFN- $\lambda$  antes de la infección seguido luego por IFN- $\alpha$  fue efectivo en controlar la viremia en los ratones. Además, el tratamiento pre y post-infección con IFN- $\lambda$  resultaba igualmente protector. La limitación de la replicación del VDVB se verificó además por la ausencia de TNF- $\alpha$  sistémico. Estos resultados entonces indicaron que el IFN- $\lambda$  resultaba efectivo contra el VDVB *in vivo*, y que no era necesario combinarlo con IFN- $\alpha$ .

Para evaluar el uso de nuestros IFNr en bovinos establecimos primero la inocuidad de los mismos sobre células sanguíneas bovinas (*ex vivo*) donde ambos IFNs mostraron ser seguros a las dosis de uso propuestas, a pesar de que el IFN- $\alpha$  causó apoptosis de células inmunes bovinas a dosis altas. La determinación de la inocuidad posológica se realizó directamente en los animales mediante el control de parámetros hematológicos durante 14 días post-inoculación, revelando la ausencia de toxicidad con las diferentes dosis de IFN- $\lambda$ r evaluadas. A partir de estos resultados se realizó una prueba de concepto en terneros para evaluar la factibilidad de la utilización de IFN- $\lambda$ r frente a la infección con una cepa de baja virulencia aislada en la provincia de Buenos Aires, del genotipo 2 y biotipo NCP, ampliamente caracterizada en nuestro laboratorio. Se seleccionaron para el estudio 6 terneras libres del VDVB, que fueron infectadas con la cepa antedicha. Cuatro de ellas

fueron inoculadas por vía sub-cutánea con dos dosis de IFN- $\lambda$ r dos días previos a la infección y dos días posteriores a la misma, mientras que las otras dos terneras recibieron tratamiento placebo (medio de dilución). Los animales infectados-no tratados desarrollaron enfermedad clínica con síntomas respiratorios entre los 2 a 4 días post-infección, detectándose también viremia y excreción viral a través de secreciones nasales. Los animales del grupo tratado con IFN- $\lambda$ r no desarrollaron enfermedad ni presentaron signos clínicos. En tres de ellos no se detectó viremia ni excreción viral nasal. Un individuo de este último grupo presentó viremia y excreción viral pero con valores menores a los del grupo no tratado.

Hemos desarrollado un antiviral seguro y eficaz, IFN- $\lambda$ 3 bovino recombinante, demostrando la factibilidad de su potencial utilización para la prevención y el tratamiento de las infecciones por el VDVB. Comprobamos el efecto antiviral del IFN- $\lambda$ r sobre cepas de campo y de referencia *in vitro*, como así también su inocuidad y eficacia en bovinos contra una cepa de campo Argentina del genotipo 2, biotipo NCP. Además, establecimos un modelo ratón de viremia por el VDVB, de gran utilidad para los estudios *in vivo* con este virus. Desarrollamos una técnica novedosa, que consiste en un ELISA en células que utiliza un anticuerpo detector contra una proteína conservada no estructural que puede ser potencialmente aplicable para medir con precisión la infectividad de cualquier cepa viral, independientemente de su capacidad de causar la muerte de células en cultivo.

Este trabajo constituye la primera evidencia experimental del potencial bioterapéutico del IFN- $\lambda$  bovino contra el VDVB *in vivo*, abriendo una nueva perspectiva enfocada en el uso de antivirales biológicos económicos, biodegradables y seguros para reducir la incidencia de las infecciones virales en animales en ámbitos productivos. La aplicación de esta herramienta podría impactar indirectamente en la disminución del uso de antibióticos al decrecer la tasa de infecciones bacterianas que devienen de las infecciones virales inmunosupresoras.

**PALABRAS CLAVE:** diarrea viral bovina; terapia antiviral; interferones; interferón lambda bovino.

---

## ABSTRACT

Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) represents a major challenge at a productive level due to its endemic nature almost worldwide. BVDV infection is highly prevalent in Argentina, causing economic losses for the dairy and livestock industry, mostly associated with reproductive problems. The disease caused by BVDV presents with a varied signology that can range from a subclinical course to acute hemorrhagic symptoms with usually fatal outcome. BVDV also causes immunosuppression that predisposes the infected animal to bacterial and parasitic infections.

BVDV belongs to the *Flaviviridae* family, genus *Pestivirus* and is represented by 3 genotypes: VDVB-1, VDVB-2 and VDVB-3 or "HoBi-like virus". In turn, this agent can be classified according to its biotype in either cytopathic (CP) and non-cytopathic (NCP). A fundamental characteristic of VDVB is its ability to generate persistent infections. The birth of persistently infected animals (PI) occurs when the pregnant females become infected with a NCP strain of the BVDV between days 30 and 150 of gestation. These individuals are not able to mount an immune response and eliminate large amounts of virus in all excretions and secretions. Currently, two main measures are proposed for the control of the disease: the detection and segregation of PI animals, and the subsequent vaccination of the entire non-PI herd. The immunity conferred by vaccines that are on the market requires more than two weeks to develop and even more than one dose, moreover, its efficacy is non-optimal in the presence of maternal immunity.

An additional disadvantage is that most of the commercial formulations do not provide coverage against all virus strains circulating in the field. To complement the set of tools for VDVB control, antivirals are needed that can prevent viral dispersion, avoiding immunosuppression. Antivirals could be used in cases of outbreaks or as preventive before certain maneuvers such as transport, confinement, insemination, introduction of new animals, etc. In this work we propose the use of Interferons (IFNs) since they are natural antivirals, of simple production and broad spectrum. In contrast to the adaptive immune response, the innate mechanisms of immune defense mediated by IFN are immediate and functional even in the early stages of intrauterine development. The administration of IFNs as biotherapeutic agents is an effective measure for the treatment of several viral infections. Traditionally in therapies developed for humans, type I IFN (IFN- $\alpha$ ) has been used, which is currently being replaced due to its hematological toxicity, by type III IFN- $\lambda$ . IFN- $\lambda$ 's antiviral effect is identical to IFN- $\alpha$  but localized in epithelia, without effect on blood cells. The IFN- $\lambda$  family is conserved in cattle and treatment with IFN- $\lambda$ 3 was successful in controlling oronasal infection with foot-and-mouth disease virus (FMDV). The therapeutic application or functionality of IFN- $\lambda$ 3 to other viruses affecting livestock production has not been studied.

This work proposes the following hypotheses: "Bovine IFN- $\lambda$ 3 has antiviral activity against BVDV"; and "recombinant bovine IFN- $\lambda$ 3 is a candidate to be used as a biotherapeutic agent against BVDV infections". To test these hypotheses, we have cloned and expressed the bovine INF- $\lambda$ 3 and IFN- $\alpha$  in a recombinant system and evaluated their antiviral activity

against different strains of BVDV both *in vitro* and *in vivo* to determine their potential use as biotherapeutics.

The recombinant IFNs (rIFN) produced in supernatants of transfected HEK293T cells were quantified in active units determined on reference viruses and also using a reporter assay of activity based on Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK) stably transfected with an MxA promoter upstream of the ORF for chloramphenicol acetyltransferase (CAT). To establish the sensitivity of VDV field and reference strains to the rIFN, we developed a high-throughput technique applicable to CP and NPC strains. It is an *in-cell* ELISA that allows the direct measurement of the infection by detecting a non-structural protein of the virus in cultured cell in microplates, without the need to harvest the cells. Using this assay, we estimated the 50% inhibitory concentration for each rINF using six strains of BVDV of different biotype and genotype, verifying that the CP strains are more susceptible to both rIFN than the NCP and, particularly, the NCP type 2 strains were more sensitive to IFN- $\lambda$ .

The activity of the rIFN was then evaluated *in vivo*, in a murine model of virulence developed in our laboratory, in which BALB/c mice infected with type 2 strains of the BVDV develop viremia at 4 or 7 days after infection. (dpi), according to the virulence of the strain. The high virulence strain also suppressed the pro-inflammatory response in these animals. Treatment of mice with commercial murine rIFN showed that IFN- $\lambda$  would be more efficient in preventing infection while IFN- $\alpha$  would prevent viremia. Experiments of combined treatment with two doses of antiviral pre- and post-infection, combining the use of both rIFN, revealed that the treatment with IFN- $\lambda$  before the infection followed then by IFN- $\alpha$  was effective in controlling the viremia in the mice, and that a pre- and post-infection treatment with IFN- $\lambda$  was equally protective. These results then indicated that rIFN- $\lambda$  was effective against BVDV *in vivo*, and that it would not be necessary to combine it with IFN- $\alpha$ .

In order to evaluate the use of our rIFNs in cattle, we first established their safety on bovine blood cells (*ex vivo*). Both rIFNs were safe at the proposed usage doses, despite the fact that IFN- $\alpha$  caused apoptosis of immune cells when tested in very high doses. Safety studies were carried out directly in the animals by assessing several hematological parameters post-inoculation, with satisfactory results. We then performed a proof-of-concept experiment in calves to evaluate the antiviral activity of rIFN- $\lambda$  against infection with an Argentinean field strain (genotype 2, NCP) isolated in Buenos Aires province, which had been extensively characterized in our laboratory. Six BVDV free calves, which were infected with the above strain, were selected for the study. Four of them were inoculated subcutaneously with two doses of rIFN- $\lambda$  two days before infection and two days after infection, while the other two calves received placebo treatment (dilution medium). The untreated-infected animals developed clinical signs of respiratory disease between 2 and 4 days post-infection, viremia and viral excretion through nasal secretions were also detected. All the animals of the rIFN- $\lambda$  treated group did not develop disease, none of them showed clinical signs. Three of them did not even present viremia or shedding.

Only one individual of the latter group presented viremia and shedding with lower values than those of the untreated group. We have developed a recombinant IFN- $\lambda$ , a safe and effective antiviral, and demonstrated its potential use for the prevention and treatment of BVDV infections. We verified its antiviral effect against field and reference strains *in vitro*, as well as its innocuity and efficacy in cattle

against an Argentinean field strain. We have established the BVDV mouse model of viremia which is very useful for studies with this virus *in vivo*. We developed a novel technique, consisting of an In-cell ELISA that uses a detector antibody against a conserved non-structural protein that can be potentially applicable to accurately measure the infectivity of any viral strain, regardless of its ability to cause cell death in culture. This work constitutes the first experimental evidence of the activity of bovine IFN- $\lambda$  as a biotherapeutic tool against BVDV *in vivo*, opening a new perspective focused on the use of economic, biodegradable and safe biological antivirals to reduce the incidence of viral infections in animals in productive environment .

The application of this tool could indirectly impact the decrease in the use of antibiotics by decreasing the rate of bacterial infections that result from immune-suppressive viral infections.

KEY WORDS: bovine viral diarrhea; antiviral therapy; interferons; bovine interferon lambda

## TABLA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-Azino-Bis (3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico) Diamonio
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Copia
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNdc	Ácido Ribonucleico Doble Cadena
BHK-21	Del Ingles "Baby Hamster Kidney"
CAT	Cloranfenicol-Acetil-Transferasa
CD	Células Dendríticas
CE50	Concentración Efectiva 50
CMH-I	Complejo Mayor De Histocompatibilidad De Tipo I
CMH-II	Complejo Mayor De Histocompatibilidad De Tipo II
CMSP	Células Mononucleares De Sangre Periférica
CP	Citopático
CPA	Células Presentadoras De Antígenos
DE	Desvío Estandar
DITC50/ml	Dosis Infecciosa De Tejidos 50
DO	Densidad Óptica
dpi	Días Post Infección
dpv	Días Post-Vacunación
ECP	Efecto Citopático
ELISA	Del Inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay "Ensayo Por Inmunoabsorción Ligado A Enzimas"
HEK293T	Del Ingles "Human Embryon Kidney 293"
His-Tag	Etiqueta de Histidinas
hs	Horas
IFD	Inmunofluorescencia Directa



IFN	Interferón
IFNr	Interferon/Es Recombinante/S
IFN- $\alpha$	Interferón Alfa
IFN- $\alpha$ r	Interferón Alfa Recombinante
IFN- $\gamma$	Interferón Gamma
IFN- $\lambda$	Interferón Lambda
IFN- $\lambda$ r	Interferón Lambda Recombinante
INFs	Interferones
INTA	Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria
IP	Infección Persistente
ip	Intraperitoneal
ISGs	Del Inglés "Genes Estimulados Por Interferón"
IT	Infección Transitoria
MDBK	Del Ingles Madin Derby Bovine Kidney
MEM-D	Del Ingles Modified Eagles Medium By Dulbecco
min	Minutos
MOI	Multiplicidad de Infección
NCP	No Citopático
NK	Del Ingles "Natural Killer"
OAS	Oligo-Adenilato-Sintetasa
ORF	Del Ingles "Open Reading Frame"
pb	Pares de Bases
PFA	Para-Formaldehído
PI	Persistentemente Infectado
PMS	(N-Metil Dibenzopirazina Metil Sulfato)
PTC12	Phenyl Thiophene Carboxamide Derivado 12
RFB	Riñón Fetal Bovino
RIG-1	Gen Inducido Por Ácido Retinoico

RPMI	Medio De Cultivo RPMI 1640
SC	Score Clínico
sc	Subcutáneo
seg	Segundos
SFB	Suero Fetal Bovino
SN	Seroneutralización
SNE	Suero Normal Equino
TI	Transitoriamente Infectado
TNF- $\alpha$	Factor De Necrosis Tumoral Alfa
TSC	Thiosemicarbazona Derivada De 5,6-Dimethoxy-1-Indanone
UFP	Unidades Formadoras De Placa
UTR	Del Ingles "Unstranlated Region"
VDVB	Virus De La Diarrea Viral Bovina
VFA	Virus De Fiebre Aftosa
VHB	Virus De La Hepatitis B
VHC	Virus De La Hepatitis C
VSV	Virs De La Estomatitis Vesicular

---

## INTRODUCCIÓN

### ETIOLOGÍA

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un agente infeccioso responsable de producir grandes pérdidas económicas en el ganado bovino a nivel mundial. El VDVB pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Pestivirus*. Infecta rumiantes domésticos y salvajes, cerdos y jabalíes [1]. Los virus del género *Pestivirus* tienen un diámetro de 40-60 nm y se catalogan entre los virus de menor tamaño.

A partir del “*Flaviviridae* Study Group” perteneciente al Comité Internacional de Taxonomía Viral, han surgido recientes propuestas para revisar la taxonomía del género *pestivirus* con el fin de incluir siete especies adicionales. Se propone un sistema de denominación uniforme en donde cada especie será representada con una letra mayúscula. Las Cuatro especies ya existentes reciben las siguientes denominaciones: *Pestivirus A* (Virus de la Diarrea Viral Bovina tipo 1), *Pestivirus B* (Virus de la Diarrea Viral Bovina tipo 2), *Pestivirus C* (Virus de la Fiebre Porcina Clásica) y *Pestivirus D* (Virus de la Enfermedad de la Frontera). Se han asignado letras a 7 nuevos *pestivirus* según la especie animal que afectan siguiendo un orden alfabético, aunque con algunas variaciones para hacerlo más sencillo de recordar como por ejemplo: *Pestivirus G* a los *pestivirus* de Jirafas por su nombre en Inglés *Giraffe* [1]. Esta revisión agrupa 11 especies de *Pestivirus* (A-K).

### HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad causada por el VDVB fue descrita por primera vez en 1946 junto con el aislamiento del virus a partir de un bovino enfermo [2]. Fue caracterizada por producir leucopenia, hipertermia, depresión, diarrea y deshidratación, anorexia, salivación, descargas nasales, erosión gastrointestinal y hemorragias en varios tejidos.

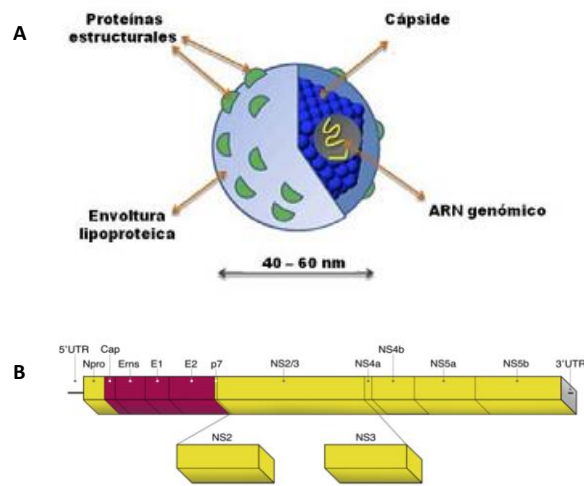
En 1957 se descubrió que el agente viral aislado no era citopático *in vitro* [3], pero luego en 1960 Gillespie y colaboradores [4] reportaron el primer aislamiento de una cepa CP que permitió el desarrollo de ensayos de seroneutralización (SN), entre otros.

El VDVB es un patógeno que ocasiona pérdidas económicas para la industria ganadera nacional [5] y mundial, principalmente debido a complicaciones reproductivas [6, 7]. La infección por el VDVB puede ser aguda subclínica, clínica, fatal (síndrome denominado “Enfermedad de las Mucosas”) o causar cuadros reproductivos de infertilidad, abortos y anomalías congénitas [8, 9]. La infección de hembras preñadas entre los 30 y 150 días de gestación es de alta relevancia epidemiológica ya que el ternero nace inmunotolerante a la cepa infectante y presenta una infección persistente (IP) que mantiene la circulación viral en el rebaño [10].

### MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA VIRAL

El VDVB es un virus envuelto, característica que lo hace susceptible a la inactivación mediante solventes y detergentes. Cuenta con un genoma de ARN de cadena simple en

sentido positivo [11] de 12,3 Kb que presenta un marco de lectura abierto (ORF) flanqueado por regiones no traducidas (UTR), que traduce una poli-proteína de alrededor de 4000 aminoácidos. Esta poliproteína da lugar a proteínas estructurales y no estructurales: C, Erns, E1, E2, Npro, p7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B [12] (Figura 1). El extremo 5'UTR es una parte altamente conservada del genoma viral y comprende un sitio para el acoplamiento ribosomal implicado de manera esencial en la traducción de la poliproteína viral [13][14].



**Figura 1.** (A) Representación esquemática del VDVB y (B) ORF del genoma de VDVB y las proteínas para las que codifica. J.D. Neill et al. 2013

La replicación del ARN genómico ocurre en el citoplasma de la célula huésped. Las proteínas virales, generadas a partir del procesamiento de la poliproteína traducida, participan de la replicación viral. Dicha etapa se lleva a cabo a través de un complejo de replicación, compuesto por ARN viral y proteínas no estructurales, en asociación con las membranas intra-citoplasmáticas. El proceso comienza con la síntesis de cadenas negativas complementarias que son utilizadas como molde. Las partículas virales son ensambladas y envueltas en membranas intracelulares, transportadas en vesículas citoplasmáticas a través de la vía secretoria y liberadas por exocitosis [15].

## PROTEÍNAS VIRALES

### PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

La cápside posee una estructura icosaédrica formada por una única proteína (proteína capsidal "C"), limitada por una envoltura conformada por 3 glicoproteínas de membrana E1,

E2 y Erns. La proteína C se encuentra altamente conservada entre los miembros del género pestivirus al igual que la Erns, una proteína glicosilada con actividad ribonucleasa que degrada activamente el ARN de simple y doble cadena. Aunque no está del todo dilucidado el rol de la Erns dentro del ciclo de replicación viral, se cree que cumple una función importante en la limitación de la respuesta inmune del hospedador y su presencia es un indicador de la infección viral [16]. Las proteínas E1 y E2 son necesarias para la entrada del virus a la célula. La E2 es una glicoproteína inmunodominante y posee epítopes neutralizantes. Se han producido diferentes anticuerpos monoclonales contra esta última proteína para identificar las diferentes cepas virales [17].

### PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

La primera proteína no estructural traducida del ARN viral se la denomina “Npro” y es única dentro del género pestivirus. Tiene actividad autoproteasa y puede clivarse a sí misma de la poliproteína. Se demostró que *in vivo* bloquea la producción de interferón (IFN) de tipo I enviando a degradación proteosomal al IRF-3, un importante inductor de la producción de IFN en células infectadas [18], [19]. La proteína p7 es pequeña y se escinde de manera ineficiente de la proteína E2, es por eso que en células infectadas puede hallarse como p7 libre o como E2-p7. Las proteínas NS2 y NS3 son traducidas inmediatamente luego de p7. Su clivaje es posible gracias a la actividad proteasa de la NS2. La NS3 tiene 2 actividades enzimáticas: una de ellas es la función serin-proteasa necesaria para la viabilidad viral y, además, tiene un dominio ARN-Helicasa que participa en la replicación de ARN viral. Es una proteína que se encuentra altamente conservada y su presencia es un indicador de infección. La NS4A es un cofactor de la serin-proteasa NS3 [17].

Las proteínas NS5A y NS5B pueden estar presentes en las células infectadas como formas independientes o sin clivar. La NS5B funciona como ARN polimerasa ARN dependiente, siendo la principal proteína en la replicación del ARN genómico [20].

### **GENOTIPOS Y BIOTIPOS VIRALES**

El VDVB se clasifica en dos genotipos: VDVB-1 y VDVB-2, según la secuencia genética de la región 5'UTR y de las secuencias codificantes para Npro y E2 [21]. Dentro del VDVB-1 se han descrito 21 sub-genotipos diferentes (1a-1u) [22] y dentro del VDVB-2 hay 4 sub-genotipos (2a-2d) [23]. El VDVB es endémico a nivel mundial, prevaleciendo diferentes genotipos según las distintas regiones geográficas [22]. Recientemente, una nueva variante, denominada VDVB-3 o “Virus HoBi-like”, ha sido aislada en países como Brasil, Italia, Tailandia e India, entre otros [24]; este patógeno genética y antigénicamente relacionado con el VDVB-1 y 2 causa una enfermedad similar a la tradicionalmente asociada con el VDVB. El VDVB-3 no ha sido aislado en Argentina hasta el momento. Sin embargo, a partir de muestras bubalinas del noreste argentino se ha encontrado evidencia serológica de la circulación de esta variante viral [24].

El genotipo más frecuentemente reportado a nivel mundial es el 1b, seguido del 1a y 1c. Considerando los continentes de manera individual, VDVB-1b es el sub-genotipo predominante en las Américas, Asia y Europa. En cambio, el 95,9% de los aislamientos de campo en Australia fueron clasificados como VDVB-1c [22].

El genotipo 1 incluye los aislamientos clásicos que son usados comúnmente como cepas de referencia y vacunales. El genotipo 2 incluye cepas asociadas a una alta mortalidad, infecciones agudas y trombocitopenia [25]. A pesar de que ambos genotipos pueden provocar enfermedad, los casos más severos son comúnmente atribuidos al VDVB-2 [26]. La variabilidad genética descrita para VDVB-1 y VDVB-2 dificulta el control de la enfermedad ya que el diagnóstico y la vacunación pueden funcionar correctamente para cepas homólogas entre sí, pero resultar menos eficaz en virus genéticamente diferentes. El VDVB presenta dos biotipos, citopático (CP) y no citopático (NCP), según el comportamiento del virus en cultivo de células. Ambos biotipos pueden causar enfermedad en los bovinos, sin embargo, la mayoría de las cepas circulantes en los rodeos pertenecen al biotipo NCP. El biotipo CP ha sido aislado únicamente en conexión con brotes de Enfermedad de las Mucosas. Los virus CP son el resultado de ciertos cambios en la secuencia codificante de la proteína NS2/3, a partir de varias recombinaciones no-homólogas, que produce el clivaje de NS2/3 en NS2 y NS3. Esta alteración genómica genera la producción ilimitada de NS3 durante el ciclo de replicación viral. Algunas cepas CP aisladas han presentado cambios genómicos en la proteína Npro, C y NS4B [17]. Las cepas CP no son más patogénicas que las NCP como su nombre podría sugerir. Las cepas NCP tienen tropismo por los leucocitos, órganos linfoides y tracto respiratorio, mientras que las cepas CP están en general restringidas al tracto digestivo [27].

## PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El VDVB produce una amplia variedad de manifestaciones clínicas que van desde estados subclínicos de la enfermedad hasta cuadros severos pudiendo ocasionar incluso la muerte. Estas diferentes presentaciones de la enfermedad son producto de la interacción de factores tales como cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, preñez y período de la misma, factores estresantes y otros factores concurrentes. Una particularidad importante a destacar del VDVB es la capacidad de causar inmunosupresión en el animal infectado y tornarlo más susceptible a contraer infecciones secundarias. Por este motivo, ha sido reportado que algunas enfermedades ven incrementada su frecuencia en los rodeos en los que está presente el VDVB, algunos ejemplos son Rotavirus, Coronavirus, Salmonella, Pasteurella, Herpesvirus Bovino, etc [28]. Los animales infectados presentan leucopenia que según la virulencia de la cepa infectante puede extenderse entre cuatro y veinte días [21].

Virus monocitotrópicos como VDVB son capaces de infectar células presentadoras de antígeno y sus efectos dependen de la población celular infectada. Células dendríticas (CD) y monocitos son susceptibles a la infección con VDVB CP y NCP [29]; sin embargo, solo los monocitos sufren lisis celular cuando están infectados con VDVB CP. El mecanismo por el cual la CD sobrevive a la infección por VDVB CP aún no está completamente claro, sin embargo se ha sugerido que la infección de las CD con VDVB podría interferir con su funcionalidad [30] ya que se observa supresión de la respuesta inmune e inducción de apoptosis sin infección de los linfocitos. Se ha demostrado que las variantes CP y NCP de VDVB tienen diferente capacidad de infectar y replicar en CD [31]. Las células dendríticas de ganglios linfáticos, las cuales constituyen la población más importante de células

presentadoras de antígenos (CPA), no se afectaron en su capacidad de presentar antígenos a las células Th o expresar MHC II en su superficie luego de la infección con la cepa PE515 CP ó NCP aislada previamente de un caso de enfermedad de las mucosas [30]. Nuestro grupo ha demostrado que la incapacidad de las CD infectadas de presentar otros antígenos se mantiene durante las primeras 24h posteriores a la infección [29].

Monocitos infectados *in vitro* con las cepas NY-1 NCP ó NADL CP por 1 hora, mostraron un aumento en los niveles del ARN mensajero (ARNm) de TLR-3. Sin embargo, después de 24 horas post infección, fue predominante el aumento del ARNm de TLR-7 [32]. En ese estudio también se pudo observar un incremento de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) después de 1 hora de infección con la cepa CP, pero llamativamente luego de infectar monocitos con virus CP ó NCP por 24 horas, se detectó una menor cantidad de ARNm de TNF $\alpha$  y de IL-1 $\beta$ , lo cual podría ser un indicativo de reducción en la activación de los monocitos infectados [33].

La diferencia en la capacidad de los dos biotipos de VDVB para estimular el sistema inmune innato influenciaría el desarrollo de la respuesta adaptativa [34]. La infección con VDVB CP en la superficie mucosal o epitelial promueve la producción de citoquinas como IFN- $\alpha/\beta$  por diferentes poblaciones e IFN- $\lambda$  principalmente por las CD plasmacitoides [35]. Estas citoquinas activan las células efectoras del sistema inmune innato como eosinófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NK). Una combinación de la acción directa de las citoquinas con la función efectora de las células del sistema inmune innato limitaría la replicación del virus. La infección con VDVB NCP, al contrario de la descrita para el biotipo CP, no estimula la producción temprana de IFN de tipo I, favoreciendo la replicación viral y su dispersión a nivel sistémico. Cuando el VDVB libre migra a los nódulos linfáticos locales, el virus encontrará CD plasmacitoides y grandes cantidades de IFN- $\alpha/\beta$  y  $\lambda$  producido por esta subpoblación de células. El aumento en las concentraciones de IFN- $\alpha/\beta$  en sangre y tejidos aumentaría la activación de las CD y limitaría la replicación viral, pero esta respuesta sería tardía porque el virus ya estaría diseminado a nivel sistémico.

Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune adaptativa montados por el virus son diferentes y entre ellos se incluye la disminución de la presentación antigénica y de moléculas co-estimuladoras. El tipo de respuesta inmune varía según el biotipo viral infectante. En el caso de infecciones con una cepa CP la respuesta T aparenta ser principalmente de tipo T helper 1, mientras que una infección con una cepa NCP induce una respuesta T helper 2 [36]. En el caso particular de una infección con una cepa CP se observa un reclutamiento de los linfocitos hacia el espacio bronquio-alveolar.

Existen cepas de alta patogenicidad pertenecientes al genotipo 2 que pueden provocar infecciones agudas graves, con altas tasas de mortalidad caracterizadas por signos tales como: hipertermia elevada, diarrea profusa, alta incidencia de abortos, reducciones significativas en la producción de leche y cuadros de muerte súbita [37]. Aun existiendo estos casos de mayor gravedad clínica, la mayoría de las presentaciones del VDVB a nivel de los rodeos es de alta morbilidad y baja mortalidad. El complejo respiratorio bovino es descrito como una de las enfermedades más costosas para la industria ganadera a nivel mundial. Se describe como una entidad multifactorial en la cual los virus: Herpesvirus Bovino 1, Parainfluenza Bovina 3, Virus Sincicial Respiratorio Bovino o VDVB actúan como los agentes infecciosos primarios, generando lesiones de la mucosa y comprometiendo la

integridad del tracto respiratorio, ocasionando a continuación una inmunosupresión y por lo tanto predisponiendo la colonización de las mucosas por bacterias que actúan como invasores secundarios agudizando la severidad del cuadro clínico [38].

La principal vía de transmisión de VDVB es el contacto directo con animales que excretan virus, principalmente aquellos persistentemente infectados (PI). Las infecciones transitorias (IT) pueden ser divididas en cuatro categorías: Aguda, infección hemorrágica, enfermedad respiratoria bovina e inmunosupresión [39]. Además de estas cuatro presentaciones el VDVB también puede provocar una enfermedad de tipo crónica y enfermedad de las mucosas en animales PI [40].

## INFECCIÓN AGUDA

La transmisión de la enfermedad se da principalmente por el contacto directo con animales que excretan virus, principalmente los PI, presentes en el rodeo durante el pastoreo, encierro, transporte y demás situaciones de manejo según el tipo de explotación ganadera que se considere. Moscas, aerosoles y equipamiento veterinario contaminado también están implicados en la diseminación viral [28].

La infección aguda en animales *naïve* y no gestantes comienza aproximadamente a los 3 días post-infección (dpi) con una viremia transitoria que puede extenderse entre dos y hasta nueve días según la virulencia de la cepa infectante [21]. La inmunidad se desarrolla generalmente no antes de los 18-21 dpi. Una vez establecida la inmunidad los animales se recuperan completamente (~21 dpi).

La infección cursa con leucopenia, linfopenia y/o trombocitopenia, inmunosupresión, pirexia y diarrea [41]. La linfopenia puede durar entre una a tres semanas, según la virulencia de la cepa. La inmunosupresión resultante predispone a infecciones secundarias con microorganismos oportunistas que producen enfermedades respiratorias o gastrointestinales que revisten mayor gravedad.

Las infecciones agudas producen efectos en la fertilidad como la reducción de preñez, muerte y reabsorción embrionaria, abortos y defectos congénitos. En los toros, se observa reducción de la densidad y motilidad espermática. Esta reportado que el VDVB puede persistir en semen durante 2,75 años luego de una infección aguda [42].

## INFECCIÓN CONGÉNITA

Las hembras preñadas pueden contraer una infección subclínica o leve del VDVB y aún así generarse una reabsorción embrionaria, aborto o transmisión vertical del virus al feto. La infección transplacentaria ocurre de manera eficiente en hembras seronegativas, sin embargo, se considera que la inmunidad adquirida de forma natural provee una buena protección pero no necesariamente completa frente a la infección fetal la cual es compleja y su desarrollo depende del momento de la gestación en que ésta tenga lugar [15].

Durante los primeros 18 días de gestación, período en que el embrión aún no está implantado, no hay infección posible ya que el VDVB no puede atravesar la zona pelúcida [43]. Una vez que los cotiledones se desarrollan del día 29-41 de gestación, puede darse la



infección fetal lo que producirá muerte embrionaria y en consecuencia una disminución en los índices de preñez.

Las infecciones a partir del día 30 y durante el primer trimestre de gestación dan como resultado el nacimiento de animales PI. Una vez que el sistema inmune del feto ya está desarrollado, entre el día 80 y 150, una infección puede producir efectos teratogénicos como atrofia cerebelar, degeneración ocular, braquignatia y retraso en el desarrollo de huesos, timo y pulmones. La infección viral durante esta etapa también puede producir abortos sin efectos en la vaca. A partir del día 175 de gestación el feto es inmunológicamente competente y las infecciones en este período resultan en el nacimiento de terneros seropositivos normales o débiles, mientras que los abortos son ocasionales [44].

## INFECCIÓN PERSISTENTE

Una característica fundamental del VDVB es la capacidad de generar animales PI. Estos animales se generan cuando las hembras preñadas se infectan con el VDVB entre los días 30 y 150 de gestación [45]. La habilidad de las cepas NCP del VDVB de inhibir la inducción de IFN de tipo I en el feto permitiría al virus sobrevivir en el hospedador y establecer la infección persistente. Estos animales PI son inmunotolerantes a la cepa infectante, por lo que no son capaces de montar una respuesta inmune con producción de anticuerpos ni de eliminar el virus. Por lo tanto, se hallará gran cantidad de VDVB en las excreciones y secreciones incluyendo leche, semen, saliva, secreción nasal, orina, sangre y aerosoles. El virus está ampliamente distribuido en linfonódulos, epitelio del tracto intestinal y células linfoideas, pulmones, piel, timo y el cerebro de los animales PI.

Los animales PI son claves desde el punto de vista epidemiológico ya que son una fuente constante de eliminación del virus hacia el resto del rodeo. En cambio, los animales TI, son menos importantes para la diseminación de la enfermedad ya que excretan el virus durante un período máximo de aproximadamente 10 días. Al ser ambos animales virémicos, es necesario realizar dos determinaciones diagnósticas de antígeno separadas por un intervalo de por lo menos 3 semanas para distinguir entre PI Y TI [28].

La prevalencia de animales PI en los rodeos va de 0,5 a 2% [46]. Esta variación puede verse influenciada por diversos factores externos como el periodo de toma de muestra, tipo de producción, edad de los animales, uso de vacunas contra el VDVB y técnica diagnóstica, entre otras.

Los animales PI pueden ser clínicamente sanos, pero muchos de ellos pueden ser más pequeños y débiles. Algunos pueden mostrar disminución en la ganancia de peso y enfermedades crónicas. Posteriormente a su nacimiento el ternero es susceptible de contraer la enfermedad de las mucosas. Sumado a estos inconvenientes, los animales PI son generalmente más susceptibles de contraer infecciones secundarias, sugiriendo un pobre status inmunitario. Por otro lado, la infección persistente en toros está asociada a hipoplasia testicular, sin embargo hay animales PI que mantienen su capacidad reproductiva [39].

## ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS

La enfermedad de las mucosas solo se desarrolla en animales PI y dicha presentación de la enfermedad cursa con un desenlace fatal. Su presentación es esporádica y se desarrolla cuando la cepa infectante NCP del animal PI muta a CP [39].

Los signos clínicos de esta presentación incluyen fiebre, anorexia, taquicardia, polipnea, disminución de la producción láctea y profusa diarrea acuosa. Esta diarrea presenta restos de filamentos mucosos, fibrina, sangre y mal olor. Pueden presentarse además erosiones y úlceras en lengua, paladar y encías; erosiones epiteliales en la región interdigital, bandas coronarias, pezones, vulva y prepucio. Otros hallazgos son la presencia de neutropenia y trombocitopenia. Pueden también manifestarse infecciones bacterianas secundarias como neumonía, mastitis y metritis [44].

Una pequeña proporción de los individuos con síntomas agudos de la enfermedad de las mucosas no muere pero desarrolla una forma crónica de la enfermedad. La signología típica es la diarrea intermitente, debilidad muscular, anorexia, lesiones en la piel y descarga nasal y ocular [44].

## INFECCIONES VENÉREAS

El virus está presente en el semen de toros PI así como también lo está en el semen de toros inmunocompetentes transitando una infección aguda. Estos toros pueden eliminar el virus a través del semen durante periodos prolongados (meses). Es por eso que se recomienda el análisis de semen previo a inseminaciones artificiales o cualquier otra estrategia de manejo de preñez en el rodeo [42].

## SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD A NIVEL MUNDIAL

La infección por VDVB tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas, con rangos de seropositividad de 60-80% y presencia del 0,5-2% de animales PI [47]. En todos los países donde se realizaron estudios de prevalencia sobre poblaciones bovinas no vacunadas, se han detectado anticuerpos contra VDVB [74] [75] [76] [77]. Asumiendo que la presencia de anticuerpos refleja la exposición al virus, se puede concluir que el VDVB está distribuido en todo el mundo.

La mayor incidencia a nivel mundial de animales PI se observó en tambos, animales mayores de 6 meses, rodeos no vacunados, animales con signos clínicos, animales excluidos en programas de control y/o erradicación y aquellos evaluados mediante técnicas basadas en cultivos celulares. Por el contrario, la media de la seroprevalencia en las distintas regiones se mantuvo relativamente constante a nivel individual (48,73% al 46,23%) y a nivel poblacional (67,01% a 66,08%) [46]. A partir de este meta-análisis y mediante análisis temporales se prevé una disminución en la prevalencia de animales PI en Europa. Esto está aparentemente relacionado con los programas de control y/o erradicación que se llevan a cabo en esos países. Todas las regiones que han implementado programas de control han reducido de forma exitosa la prevalencia de animales PI. Es el caso reciente de Austria, Dinamarca, Alemania, Irlanda, Suiza, Finlandia, Suecia y Noruega.

## IMPACTO ECONÓMICO DE LA ENFERMEDAD

El VDVB genera un impacto económico negativo que se ve reflejado en los distintos tipos de explotaciones ganaderas en todo el mundo. Los efectos perjudiciales, junto con la información sobre la estructura de la población, la incidencia de la infección y el valor monetario de las pérdidas de producción se han incluido en diferentes modelos para estimar las pérdidas económicas y los beneficios de diferentes estrategias de control. Los costos asociados a infecciones por el VDVB cada 100 animales se han estimado en £13,330 en el Reino Unido en 1998. Las pérdidas estimadas en brotes de rebaños individuales en Dinamarca fueron entre 10 y 40 millones de dólares por millón de partos en 2003 [47]. Un estudio realizado recientemente en Suiza estimó que las pérdidas financieras anuales en rodeos infectados con el VDVB fueron de CHF 85-89 por vaca lechera y CHF 1337-2535 para una granja promedio, dependiendo del tipo de producción. La mediana del valor actual neto (VAN) se estimó en CHF 44.9 millones (90% del rango central: CHF 13.4 millones a 69.4 millones) [48].

En Argentina, un estudio realizado en 2013 [49] ha estimado el retraso de crecimiento de un mes en el 20% de las vaquillonas de primera lactancia en reposición (calculan un 30% como tasa de reposición), una disminución de la producción de leche en las transitoriamente afectadas y una caída del 20% de producción (3 semanas) en las infectadas. Con respecto a la tasa de abortos, se considera que la más probable es del 8%, siendo el 10% de esa proporción causado por estas enfermedades. El resultado es una pérdida de € 30-60 por vaca lechera en su ciclo anual reproductivo.

En los establecimientos tipo Feedlot se ve afectada la ganancia de peso diaria de los animales que cursan con la infección clínica o subclínica. Dicha pérdida es en promedio de 140g/día/animal, considerando una ganancia promedio de 1200 g/día/animal (Cámara Argentina de Feedlot, <http://www.feedlot.com.ar/sitio/>). La situación se ve agravada debido al manejo que se lleva a cabo en este tipo de explotaciones donde convergen diferentes situaciones que dan lugar a un campo fértil para que la enfermedad se desarrolle como es el ingreso de animales provenientes de diferentes campos, estrés por el transporte, hacinamiento y cambios dietarios. Además de contraer el VDVB, el virus genera una inmunodepresión que aumenta la probabilidad de la presentación clínica del complejo respiratorio bovino.

En los establecimientos de cría el VDVB impacta en los parámetros reproductivos y en la disminución en la ganancia de peso de los animales enfermos. Por otro lado, en las cabañas de reproductores hay que tener en cuenta que el semen es una fuente de contaminación con el VDVB y es por este motivo que los toros deben ser controlados ya que el virus puede establecer una infección transitoria o quedar alojado de manera persistente en los testículos. Por este motivo rige una normativa internacional como regional que requiere la ausencia de VDVB o de su material genético en las partidas de semen para su exportación (Resolución Mercosur 32/14).

## SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN LA ARGENTINA

Aunque no se cuenta con un análisis exhaustivo a nivel país, los datos epidemiológicos indicarían que la situación epidemiológica no diferiría de otras regiones endémicamente infectadas del mundo. En Argentina, el primer reporte de evidencia serológica data del año 1979. A partir de dicho hallazgo, varias encuestas serológicas realizadas en las regiones de pradera Pampeana y Mesopotamia, arrojaron valores de prevalencias del 41-61,8% y 25-90% (datos de INTA). A su vez, en Argentina se ha reportado la presencia de VDVB tipo 1 y tipo 2 en un trabajo realizado sobre 29 aislamientos del VDVB, en los cuales el 90% correspondió al tipo 1 y el 10% al tipo 2 [50]. En los últimos años se ha reportado una alta circulación del Sub-genotipo 1b dentro del tipo 1 a partir de aislamientos obtenidos en los últimos 15 años en la región pampeana, y se ha descrito además la presencia del VDVB de genotipos 1a, 1b y 2. En los últimos estudios filogenéticos realizados se observó el siguiente orden de frecuencia de los genotipos: 1. VDVB-1b, 2. VDVB-1a, 3. VDVB-2 [51] tanto en un estudio de caracterización de 30 aislamientos obtenidos a partir de casos clínicos en bovinos de la Pampa húmeda como en otro estudio de caracterización de 50 cepas de VDVB a partir de lotes de suero fetal bovino [52].

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de VDVB se realiza para identificar si el virus es el agente etiológico que está causando algún problema clínico en el rodeo, y para para la identificación de animales PI. Para los programas de control de VDVB, se pueden definir dos niveles de diagnóstico principales; uno de ellos vigilancia, cuyo objetivo es vigilar la prevalencia y evaluar el efecto de los esfuerzos de control tanto en el rebaño como a nivel de población. En segundo lugar, centrándose principalmente a nivel del animal individual, las investigaciones de intervención tienen como objetivo identificar los animales PI, para su posterior remoción del rodeo [53]. Además, las tareas específicas de diagnóstico aplicadas pueden ser certificación del estado no infeccioso de animales individuales, por ejemplo, fines comerciales, o para documentar la ausencia de VDVB en la contaminación del semen [54], embriones o vacunas, etc. [55], y no menos importante el uso de pruebas individuales en laboratorios de diagnóstico. El diagnóstico del VDVB puede realizarse mediante la detección de inmunidad al VDVB, o detectando el virus o antígenos virales.

## DETECCIÓN DIRECTA

La presencia del VDVB puede analizarse directa o indirectamente mediante la detección de componentes virales. Dado que el virus en sí es relativamente lábil, es importante distinguir entre virus infecciosos y no infecciosos (inactivados, neutralizados o parcialmente neutralizados) para fines de diagnóstico general. Este último a menudo permanece en bajas concentraciones en muchos materiales biológicos, por ej. suero bovino fetal utilizado para complementar medios de cultivo celular [56], y semen de toros infectados [57]. Puede ser difícil descartar la infectividad residual en tales muestras que dan positivo en la prueba del ARN viral, pero negativa en los ensayos estándar de cultivo celular.

Para evaluar antígeno viral en un gran número de muestras (sangre, leche, saliva y tejidos) se suele detectar la proteína no estructural NS2-3 (anteriormente p80 / p125) que es altamente inmunogénica y antigénicamente conservada, y como las células infectadas con el VDVB también la expresan de manera eficiente en el citoplasma, es un blanco ideal para la detección. Entre las proteínas estructurales virales, Erns (anteriormente E0 o gp48) muestra menos diversidad antigénica que E2 [58]. Se suelen detectar mediante ensayos de ELISA sándwich o de competición. En el mercado hay kits comerciales, pero también algunos laboratorios de diagnóstico veterinario realizan la técnica estandarizada por ellos mismos y validada con cepas aisladas en nuestro país.

El ARN viral se puede detectar fácilmente en casi todos los materiales de la muestra. Se debe tener cuidado para garantizar que los cebadores o las sondas utilizadas puedan detectar tanto el VDVB-1 como el -2, incluidos todos los subgrupos genéticos relevantes del virus. En la práctica, esto significa la detección de parte de la 5'-UTR del genoma viral, en la que se encuentran las regiones altamente conservadas.

### DETECCIÓN INDIRECTA

La inmunidad puede detectarse como humoral o mediada por células, activa o pasiva. Es necesario distinguir entre animales inmunocompetentes e inmutolérantes no inmunes: es decir, una única prueba negativa para el anticuerpo contra el VDVB no es finalmente concluyente; animales individuales con anticuerpos negativos también deben ser examinados para determinar presencia del VDVB. En muestras de terneros PI, los anticuerpos maternos específicos para VDVB pueden bloquear la infectividad viral o la detección de antígenos virales, por lo general hasta una edad de alrededor de cinco meses [59].

Entre los diferentes ensayos serológicos que se han utilizado a lo largo de los años se encuentran la neutralización del virus, la inmunodifusión en gel de agar, la fijación del complemento, ELISAs, la inmunofluorescencia indirecta y el western blot. La prueba de seroneutralización consiste en un sistema biológico *in vitro* que cuantifica el efecto inhibitorio de anticuerpos específicos en la replicación del virus en cultivos celulares. Por lo tanto, su uso se limita a los laboratorios virológicos. Los anticuerpos detectados son predominantemente contra E2, lo que puede resultar en diferentes títulos dependiendo de qué cepa de virus se usa en el ensayo. Las cepas de referencia establecidas son VDVB-1a, y si las cepas de virus de campo predominantes difieren antigénicamente de estas, la sensibilidad disminuye. Cuando se calibra correctamente, es un ensayo muy específico y sensible. Sin embargo, requiere mucha mano de obra, personal con experiencia y laboratorios bien equipados, y cada resultado suele demorar de 5 a 6 días. Por lo tanto, hoy día se la utiliza principalmente como prueba de referencia para fines de respaldo y calibración.

Existen dos formatos de ELISA para la detección de anticuerpos anti-VDVB; el indirecto o el de bloqueo [60]. En el formato indirecto, el antígeno viral se inmoviliza en la fase sólida a la que se unen los anticuerpos específicos. En el ELISA de bloqueo el resultado del valor de Densidad Óptica (DO) se expresa como un porcentaje de inhibición, en relación con la DO de un suero de referencia negativo. Muchos kits de ambas versiones están disponibles comercialmente. Se pueden analizar muestras de suero, plasma y leche. En principio, se

pueden usar tres tipos de antígenos, cada uno de los cuales influye en las propiedades de diagnóstico del ensayo. En la mayoría de los ELISA indirectos, se utiliza VDVB recolectado de cultivos de células infectadas, lo que permite incluir proteínas no estructurales virales. Por lo tanto, los anticuerpos analizados estarán contra el espectro completo de proteínas inmunogénicas codificadas por el virus. En segundo lugar, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, las proteínas virales individuales pueden capturarse de una mezcla de proteínas virales recolectada en un cultivo celular. Este enfoque se usa comúnmente en ELISA competitivos y permite detectar anticuerpos contra proteínas virales inmunodominantes seleccionadas (Erns, E2 o NS2-3). En tercer lugar, cualquier (combinación de) antígeno (s) viral (s), de uno o más virus puede expresarse como proteínas recombinantes, en células de insecto o procariontes; e incorporados en ELISAs indirectos o de bloqueo. Si se usan proteínas virales estructurales como antígeno, es particularmente importante verificar que se detecten anticuerpos contra BVDV-1 y -2.

## PROFILAXIS Y TRATAMIENTO

La forma de erradicación de la enfermedad consiste en la detección y eliminación de animales PI acompañados de vacunación. Teniendo en cuenta que los animales PI son la principal fuente de transmisión viral, los programas de erradicación deben apuntar hacia la eliminación de estos individuos para sanear los rodeos.

### DETECCIÓN Y ELIMINACIÓN DE ANIMALES PI

Las técnicas utilizadas para la detección de animales PI fueron mencionadas en el apartado anterior. A partir de la primera toma de muestra, el ensayo a utilizar puede arrojar un resultado positivo o negativo. En el caso de ser positivo no necesariamente se trata de un animal PI, sino que puede tratarse de un animal cursando una infección aguda o que la ha padecido recientemente. Debe realizarse la determinación 3-4 semanas posteriores y si resulta positiva nuevamente, entonces se trata de un animal PI.

También puede realizarse la detección de anticuerpos. En este caso, los animales PI son seronegativos durante toda su vida a diferencia de los no PI que luego de 3-4 semanas post-infección o post-vacunación los animales seronegativos seroconvierten alcanzando altos niveles de anticuerpos.

Entonces, cualquiera sea la técnica utilizada es importante apartar a los animales que resulten positivos en las dos determinaciones realizadas, distanciadas de 3-4 semanas entre sí.

### VACUNAS

La vacunación es la otra herramienta de control que debe utilizarse simultáneamente con la detección y eliminación de los animales PI. Además de ser el que más circula en Argentina, una característica importante del sub-genotipo 1b del VDVB es que es altamente heterogéneo desde el punto de vista antigénico. Esto significa que las cepas que agrupan en este sub-genotipo no siempre cruzan antigénicamente entre ellas. Lo contrario ocurre entre las variantes VDVB-1a y VDVB-2, que parecen ser antigénicamente más homogéneas

“intragrupo”. La finalidad de la vacunación puede ser por un lado la de generar una cobertura inmunitaria poblacional que limite el impacto de la diseminación de la infección por VDVB en el rodeo y que reduzca la severidad de los signos clínicos. Por otro lado, existe un segundo objetivo que es el de proveer protección contra infecciones transplacentarias que den origen a animales PI. Las vacunas comercializadas en Argentina que contienen el VDVB en su formulación son a virus inactivado y comúnmente, pertenecen al conjunto de “vacunas combinadas” las cuales incluyen otros patógenos virales y bacterianos asociados a los complejos respiratorio y reproductivo del bovino. La mayoría de las formulaciones está constituida por cepas de referencia de VDVB del sub-genotipo 1a y en algunos casos incluyen VDVB de genotipo 2. Llamativamente, el sub-genotipo 1b del VDVB, que se ha comprobado es el de mayor circulación, por ahora, en Argentina, no está incluido en las formulaciones comerciales nacionales [28].

La vacunación mantiene la prevalencia de animales PI del rodeo relativamente baja pero aún así no es suficiente para el control de la enfermedad. Los animales PI deberían ser eliminados del rodeo antes de aplicar el plan de vacunación, en los establecimientos donde se utiliza la vacunación suele ignorarse la implementación de medidas de bioseguridad, muchas veces las vacunas son utilizadas de forma incorrecta por ejemplo vacunación luego de la inseminación. Estos aspectos pueden explicar por qué se han detectado prevalencias de la enfermedad 1,4 veces más altas en rodeos con estrategias de vacunación comparados con los que no la aplican [46], [61].

Las vacunas inactivadas contra el VDVB brindan un “período ventana” ya que la inmunidad vacunal requiere más de 2 semanas para desarrollarse y más de una dosis para ser por completo eficaz [61]–[63]. Cuando ocurren infecciones en el campo, no existen medios para evitar rápidamente que la infección se propague a los otros animales del rodeo. Muchas veces la vacunación no es suficiente para prevenir o contener la diseminación de ciertas enfermedades. Antivirales o inmunomoduladores podrían colaborar con esta situación, disminuyendo las pérdidas económicas, muerte, sufrimiento animal y expansión de la enfermedad [63].

## INTERFERONES

Los Interferones (IFNs) fueron descubiertos como agentes antivirales durante estudios de interferencia viral. Isaacs y Lindenmann reportaron en el año 1957 que en cultivos primarios de células de pollo infectadas con Virus de Influenza se producía un factor de secreción que mediaba un estado de resistencia viral contra virus homólogos y heterólogos [64]. Justamente, recibieron este nombre ya que en aquel momento se observó que estos compuestos “interferían” con la infección viral.

Los IFNs representan un grupo de citoquinas capaces de inducir una respuesta ante una infección viral. Se trata de glicoproteínas que pueden ser secretadas por todas las células nucleadas en respuesta a infecciones virales y microbianas. Su principal función es proteger otras células contra la invasión viral y otros patógenos. También son capaces de afectar otros procesos biológicos como la regulación del crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, así como también la modulación de la respuesta inmune.

La mayoría de los vertebrados poseen tres tipos de IFNs: de tipo I, II y III (IFN-I, IFN-II, IFN-III); basado en las similitudes genéticas, estructura proteica, utilización de receptores y funciones biológicas, las cuales son características comunes entre los miembros de cada tipo de IFN pero son diferentes entre los tres tipos de dicha citoquina. Este grupo de citoquinas también puede ser clasificado según su resistencia al tratamiento con ácido siendo caracterizados de esta manera como: ácido resistentes los IFN-I y ácido lábiles los IFN-II y III [65], [66].

### INTERFERONES DE TIPO I

Los IFN de tipo I (IFN-I) fueron los primeros en ser descubiertos. Esta familia puede ser clasificada en los siguientes subtipos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$ ,  $\epsilon$ ,  $\tau$ ,  $\zeta$ ,  $\delta$  y  $\nu$ . Los IFN- $\alpha$  y  $\beta$  han sido hasta ahora los más estudiados. Las células infectadas por virus sintetizan y secretan IFN-I que actúa de forma autocrina y paracrina para inducir un estado antiviral en la célula hospedadora [67].

Los IFN-I expresan su actividad biológica a través de un receptor compuesto por dos subunidades: IFNAR1 y IFNAR2 [68], [69]. El mismo se expresa en una amplia población de células. A través de estos receptores se activa una vía de señalización que conduce a la activación de un grupo de genes controlados por el factor de genes estimulados por interferon (ISGs). Los genes producidos están involucrados en la apoptosis y en la activación de células de la inmunidad innata y adaptativa. Uno de los genes más estudiados de este grupo codifica para: la adenosina deaminasa (AD) que actúa sobre el ARN inhibiendo el inicio de la traducción y edición del mismo; La proteinkinasa R (PKR) activada por ARNdc inhibe la traducción del ARNm; La 2, 5 -oligoadenilato sintetasa (OAS) es ARNdc dependiente y activa la endoribonucleasa ARNasa L que degrada el ARN. También se encuentran las proteínas Mx: una superfamilia de proteínas con actividad GTPasa. Estos IFN tienen también actividad antitumoral. El IFN- $\alpha$  es utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer [70], pueden además limitar la infección mediante la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa [71]. Entre estas funciones se encuentra la activación de células asesinas naturales (NK) que mediante su citotoxicidad permiten la eliminación de células infectadas. También se promueve la maduración de células dendríticas (CD) que facilitan la diferenciación de las células TCD4+ en Th 1 ó 2 [72].

De esta manera, los IFN-I actúan sobre casi cualquier célula del organismo que esté siendo amenazada con una reciente infección viral, incluso las células sanguíneas, células inmunes y endoteliales [73], [74].

Es por esto que el IFN-I tiene una excelente actividad antiviral pero importantes efectos adversos cuando se lo utiliza como tratamiento, éstos incluyen anorexia, letargia, hipertermia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, entre otras [75], [76].

### INTERFERON DE TIPO II

El IFN de tipo II (IFN-II) o IFN- $\gamma$  es producido por un limitado grupo de células como las NK, células T, macrófagos, monocitos y CD mientras que, teóricamente, todas las células del organismo expresan receptores para estos IFNs [77]. La secreción por parte de NK y CPA



cumple un rol importante en la primera etapa de una infección, así como los linfocitos T son la principal fuente de este IFN en la respuesta adaptativa.

Durante la infección viral el IFN- $\gamma$  induce la expresión de AD, OAS, PKR y Mx GTPasa, ya descritas anteriormente. De manera similar a los IFN-I, los IFN-II son capaces de producir apoptosis con la regulación de FasL además de estimular la expresión de IFN-I [75]. El IFN- $\gamma$  puede amplificar la inducción de la actividad antiviral del IFN- $\alpha$  y  $\beta$ . De hecho los IFN-I y II suelen trabajar juntos para activar la respuesta inmune innata y adaptativa [69].

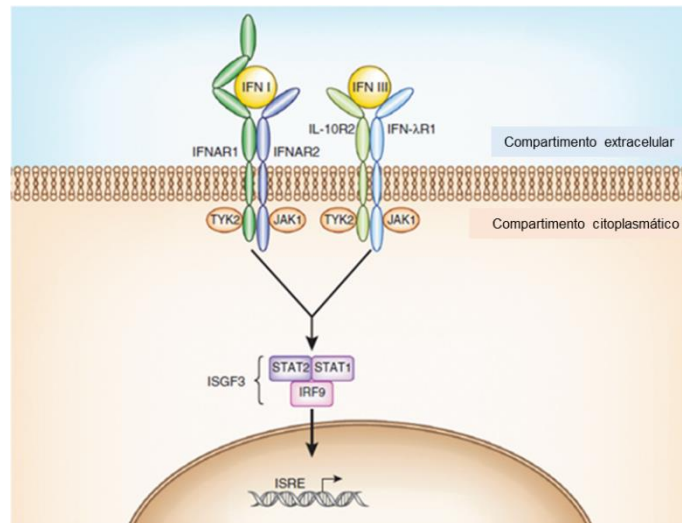
La producción de esta citoquina está controlada principalmente por la IL-12 y quimioquinas [78]. Estas quimioquinas atraen a los NK al sitio de inflamación y la IL-12 promueve la síntesis de IFN- $\gamma$  en estas células. Uno de los roles fundamentales del IFN-II es convertir a la respuesta antiviral en una respuesta adaptativa incrementando los niveles de CMH-II y moléculas co-estimuladoras que facilitan la activación de células T CD4+. Además, no sólo activa las NK sino que interviene en la modulación de respuestas Th1. También tienen un rol fundamental en la respuesta antitumoral [78].

### INTERFERONES DE TIPO III

Los IFN de tipo III (IFN-III) incluyendo IFN- $\lambda$  1, 2, 3 (llamados también IL-29, IL-28A e IL-28B respectivamente) han sido descritos por primera vez en el año 2003 por los grupos de Sheppard y Kotenko [79], [80]. Un integrante más se sumó a este grupo, el IFN- $\lambda$ 4 descrito simultáneamente en humanos por 3 grupos en el 2009 [81]–[83]. No se conoce mucho aún acerca de las diferencias entre los subtipos de IFN- $\lambda$ . A pesar de que el IFN- $\lambda$ 2 y el 3 comparten un 96% de homología, el IFN- $\lambda$ 3 tiene actividad antiviral más potente [84]. Los IFN-III pueden ser producidos por cualquier tipo celular que este siendo afectado por infección viral pero las principales células productoras de esta citoquina son las CD plasmocitoides, las células epiteliales y en menor medida, las CD derivadas de monocitos [85]. Los IFN-III están relacionados con los IFN-I. Ambos tipos de IFN poseen la misma vía de señalización y por lo tanto inducen los mismos ISGs. De hecho, ambas citoquinas son co-producidas durante una infección viral y tienen prácticamente la misma actividad antiviral.

Los receptores para estos IFN-III son un complejo compuesto por la subunidad IL-10R2 (que también forma parte esencial del complejo receptor para IL-10, IL-22 e IL-26) y la subunidad IFN- $\lambda$ R1 también conocido como IL-28RA) que es sólo utilizado por IFN- $\lambda$  [69], [86]. A pesar de que la subunidad IL-10R2 es potencialmente expresada por cualquier tipo celular, la subunidad IFN- $\lambda$ R1 se expresa constitutivamente en un limitado tipo de células, principalmente en las de origen epitelial. En humanos hay tres variantes del IFN- $\lambda$ R1 producto de *splicing* alternativo que da lugar a: una variante completa y funcional de la subunidad del receptor, a una variante soluble o a una tercera forma que carece del dominio intracelular y que aparentemente no es funcional [87]. El IFN- $\lambda$ R1 también se expresa en algunas células inmunes sanguíneas como células B, T, CD y macrófagos. Sin embargo, estas células expresan una variante corta del receptor IFN- $\lambda$ R1 que resulta en una señalización más débil al ser estimulada con IFN- $\lambda$  [75], [88]. Los fibroblastos, células endoteliales y leucocitos no expresan la subunidad en cuestión, por lo tanto no responden al estímulo con IFN- $\lambda$ .

De manera similar a lo que ocurre con los IFN-I y II, los IFN- $\lambda$  también pueden inducir la expresión de proteínas antivirales como OAS y Mx. Además de inhibir la replicación viral también es capaz de evitar y limitar las infecciones prolongadas mediante la regulación positiva de la expresión de CMH-I en la superficie celular, lo que facilita el reconocimiento y la destrucción de células infectadas por parte de la inmunidad innata mediante la apoptosis de estas células [80].



**Figura 2.** Esquema representativo de los receptores de IFN-I e IFN-III. Wack et al, 2015.

## INTERFERONES DE TIPO III:

### SU USO COMO ANTIVIRAL E INMUNOMODULADOR

Por un largo tiempo, los IFN-I han sido considerados el principal sistema de defensa antiviral, actuando de una manera paracrina y autocrina para inducir la resistencia a la infección y activar/estimular la respuesta inmune innata y adaptativa, ambas necesarias para la eliminación viral. Además, recibieron mayor interés en oncología y esclerosis múltiple como moduladores de la respuesta biológica aptos para mejorar el tratamiento [89]. Sin embargo, a pesar de que los IFN-I han sido aprobados para diversas indicaciones incluyendo verrugas genitales, hepatitis virales y ciertos tipos de leucemias, su uso en la clínica es limitado debido a sus frecuentes y severos efectos adversos que producen a nivel hematológico, incluyendo sintomatología de tipo gripal y depresión [76].

De forma similar que los IFN-I, la producción de IFN- $\lambda$  es estimulada por la infección e induce múltiples respuestas antivirales. Esto conduce a cuestionarnos si el IFN- $\lambda$  y los IFN-I son redundantes y por qué existen en el organismo dos sistemas de defensa antiviral basados en ambos IFNs. Recientes publicaciones hacen hincapié en esta pregunta y resaltan el rol preponderante del IFN- $\lambda$  en la inmunidad antimicrobiana y en particular antiviral. También se ha expuesto su potencial como terapéutico ya que muestra efectos beneficiosos con la ausencia de la actividad pro-inflamatoria de los IFN-I que causan los efectos secundarios indeseables [90].

Como se explica más arriba, la mayor diferencia entre ambos tipos de IFNs es la distribución de sus receptores. Los receptores del IFN-I son expresados por casi todos los tipos celulares, mientras que el complejo receptor para IFN- $\lambda$  es expresado principalmente en células de origen epitelial y muy pocas células inmunes, confiriendo una sensibilidad selectiva a los IFN- $\lambda$  en superficies mucosales [33], [91], [92]. De esta manera los IFN- $\lambda$  señalizan en una restringida población de leucocitos, cumpliendo una selectiva función inmunomoduladora que recién hoy está comenzando a ser comprendida.

Una función primaria emergente de los IFN- $\lambda$  es la regulación de inmunidad innata. Al contrario de los IFN-I, los IFN- $\lambda$  suprimen las respuestas pro-inflamatorias de la inmunidad innata y limitan el daño tisular asociado a la inflamación [93], [94]. Esto es sobre todo debido a su acción selectiva sobre los neutrófilos, previniendo su activación y función pro-inflamatoria. Es así como en el contexto de una infección viral como Influenza el IFN- $\lambda$  restringe la producción de TNF, IL-1 $\beta$  y otros mediadores de destrucción tisular de los neutrófilos, mientras que permite el desarrollo de una respuesta antiviral efectiva [94]. Más allá que aún no está claro si este es un efecto directo, no hay duda de que el IFN- $\lambda$  está involucrado de una manera crítica en el mantenimiento de la inflamación bajo control y limitando sus daños colaterales. El IFN- $\lambda$  puede también inducir efectos beneficiosos como por ejemplo la estimulación de la cicatrización de las mucosas [95]. La administración exógena de IFN- $\lambda$  en modelos animales de experimentación infectados con Influenza confirmó su actividad regulatoria y anti-inflamatoria e hizo hincapié en su potencial terapéutico [92], [94]. Además, mostró potencial terapéutico para otras enfermedades en las cuales el IFN- $\lambda$  no es producido de manera natural como es la artritis inducida por colágeno [33] y la trombosis arterial [96]. Este comportamiento inmunomodulador tiene cierta reminiscencia con la actividad de la IL-10 con la que el IFN- $\lambda$  comparte homología en sus secuencias y la subunidad IL10RB.

Otra importante función del IFN- $\lambda$  es la regulación de la respuesta adaptativa. *In vitro*, el IFN- $\lambda$  estimula a las CD derivadas de monocitos a generar células reguladoras T Foxp3<sup>+</sup> [97], [98]. *In vivo*, el IFN- $\lambda$  estimula el desarrollo de células Th1 en ratones [99]. Su función dual en cuanto a su regulación antimicrobiana e inmune lo hace particularmente atractivo para el tratamiento de enfermedades infecciosas y desordenes crónicos.

Durante los últimos años los IFN- $\lambda$  han emergido como una primera línea de defensa mediando la inmunidad antiviral sobre todo en las barreras anatómicas como el tracto respiratorio y gastrointestinal. También ha surgido como novedosa citoquina reguladora del sistema inmune con un rol especial en el control de daño tisular. La diferencia entre estos los tratamientos con IFN-I y III *in vivo* es, básicamente, la incidencia de los efectos secundarios [74].

## EXPRESIÓN DE INTERFERONES RECOMBINANTES

La principal fuente de heterogeneidad estructural para los IFNr durante su producción en sistemas de expresión de mamíferos es la glicosilación, que puede afectar profundamente la estructura tridimensional de la glicoproteína y su función biológica. Los IFNs son glicoproteínas secretadas, luego de transcurridos los eventos de procesamiento de glicosilación intrínseca. La producción de IFNr debería respetar estas modificaciones post-traduccionales para obtener la glicoproteína con actividad terapéutica potencial. Los IFN-I,

II y III recombinantes han sido expresados en diversos sistemas llegando hoy en día a producirse a escala industrial. El IFN- $\gamma$  humano ha sido expresado en *Escherichia coli*, células de insecto infectadas con baculovirus, células de ovario de hámster chino (CHO) y en la glándula mamaria de ratones transgénicos [100]. Se han generado grandes cantidades de IFN- $\gamma$  recombinante altamente purificado.

Los genes para IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de diversas especies se han clonado y expresado en células bacterianas. Por ejemplo, el IFN- $\gamma$  que tiene una estructura de un homodímero glicosilado, se puede producir en bacterias, no glicosilado, manteniendo la conformación dimérica y la actividad biológica [101]. La primera expresión de IFN- $\gamma$  recombinante en células de *E. coli* se llevó a cabo en los 80 [102]. El IFN- $\gamma$  expresado en *E. coli* se acumula en los cuerpos de inclusión y la extracción desde los mismos implica pasos experimentales adicionales para un re-plegamiento de proteínas a fin de obtener una conformación correcta. También se ha logrado expresar IFNs de diferentes especies en sistemas que realizan glicosilación diferente a la de células de mamíferos, como ser las células de insecto [103] y las levaduras [104]. En todos los casos se obtuvieron proteínas con actividad biológica semejante a la de sus homólogos naturales.

Más allá de ser proteínas glicosiladas la expresión de IFNs se ha realizado en diversos sistemas con la consecuente obtención de productos biológicamente activos al igual que los obtenidos en sistemas de expresión en células de mamífero. La Tabla 1 resume algunos ejemplos de los diferentes sistemas de expresión utilizados.

INTERFERON	ESPECIE	SISTEMA DE EXPRESIÓN	RENDIMIENTO	GLICOSILACIÓN
IFN- $\alpha$ [105]	humano	<i>E. coli</i>	ALTO 15mg/lit – 10 <sup>8</sup> U/lit	Sin glicosilar
IFN- $\alpha$ [105]	humano	<i>S. cerevisiae</i>	INTERMEDIO	Diferente
IFN- $\alpha$ [106]	ratón	HEK293T	BAJO	Similar
IFN- $\gamma$ [107]	ratón	HEK293T	BAJO 23x10 <sup>-6</sup> mg/lit	Similar
IFN- $\gamma$ [108]	human	<i>Pichia Pastoris</i>	INTERMEDIO 1-16x10 <sup>-3</sup> mg/ml	Semi-similar
IFN- $\tau$ [109]	bovino	Células de insecto	BAJO	Semi-similar
IFN- $\alpha$ [110]	bovino	<i>E. coli</i>	ALTO 9x10 <sup>7</sup> U/lit	Sin glicosilar
IFN- $\lambda$ [84]	humano	<i>E. coli</i>	ALTO	Sin glicosilar
IFN- $\lambda$ [111]	bovino	Adenovirus recombinante	BAJO	Similar

**Tabla 1.** Sistemas de expresión de IFN recombinantes. Se indica si hubo glicosilación y si la misma es similar o no a la de la proteína nativa.

## USO DE INTERFERONES EN ANIMALES DE PRODUCCIÓN

Se han realizado diferentes estudios para evaluar el potencial uso de IFN-I en medicina veterinaria. De hecho, en la clínica diaria de pequeños animales el IFN- $\alpha$  es administrado de manera rutinaria en el caso de sospecha o confirmación de infección viral.

Particularmente para el VDVB en el año 2004 Peek y colaboradores [112] trataron terneros PI con IFN- $\alpha$ 2a humano recombinante en una dosis de 10000 U/Kg intramuscular (IM) todos los días durante 12 semanas. Este diseño corresponde al protocolo utilizado en humanos contra el Virus de la Hepatitis C (VHC). Este IFN evaluado no mostró actividad antiviral contra VDVB-1 en terneros PI. Esto fue inesperado ya que había evidencias de actividad antiviral *in vitro*. Cabe destacar que la idea original en este ensayo fue evaluar IFN-I bovino recombinante pero los mismos no estaban disponibles. De todas maneras siguieron adelante con el ensayo utilizando IFN humanos debido a la afinidad entre los IFN- $\alpha$  recombinantes humano y los receptores para IFN- $\alpha$  bovino [113]. Además de no observarse actividad antiviral *in vivo* durante el estudio, la anemia observada durante el periodo de evaluación se recompuso una vez suspendido el tratamiento. De esta manera se pudo inferir que dicho signo era resultado directo del tratamiento. A diferencia de lo descrito en humanos (ver arriba), en este caso no se detectaron anomalías físicas en los terneros tratados durante el estudio. De hecho, continuaron con su normal alimentación y ganancia de peso diaria. La ausencia de signos de dolor o hinchazón en el sitio de inyección, cojera o alta actividad enzimática muscular sugieren que el tratamiento con IFN fue bien tolerado. El grupo de Hiroshi Sentsui y col. [114] trabajó con CMSP de animales infectados con VDVB aplicándoles un tratamiento con IFN- $\alpha$  humano de 1000 U/ml. El IFN suprimió de manera significativa las cepas CP y NCP evaluadas. Se utilizaron citoquinas comerciales de origen humano debido a su disponibilidad en el momento del ensayo.

Otro IFN evaluado fue el IFN- $\tau$  en animales PI. Se contaba con resultados previos *in vitro* que eran alentadores trabajando con dosis de 100 U/ml. Al realizar los experimentos *in vivo* se utilizaron dosis de  $10^5$ - $10^6$  U/Kg 5 veces por semana durante 2 semanas. No se observaron alteraciones físicas ni efectos secundarios. Se observó una disminución leve en el título viral en suero pero se recuperó rápidamente una vez suspendido el tratamiento [63], [109].

Otros estudios se realizaron evaluando el uso de IFN frente a otras enfermedades de interés veterinario. En el 2011 Diaz San Segundo y col. [111], [115] reportaron la identificación, clonado y caracterización del IFN- $\lambda$ 3 bovino. Los análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas indicaron que el IFN- $\lambda$ 3 bovino clonado mostraba una homología significativa con respecto a la secuencia porcina, humana y murina identificadas previamente y a las secuencias predichas de perro, pollo, rata y mono. En este trabajo utilizan un vector Ad5 para expresar IFN- $\lambda$ 3 bovino y evaluaron su actividad antiviral contra el Virus de Fiebre Aftosa (VFA) y Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) *in vitro* e *in vivo*. Los resultados indicaron que el IFN-III se comporta de manera similar que en otras especies ortólogas y tiene el potencial de poder ser desarrollado como bioterapéutico para limitar la infección con VFA, replicación y/o diseminación.

## ANTIVIRALES CONTRA EL VDVB

No se encuentran actualmente en el mercado productos antivirales para uso en bovinos, a pesar de que se han hecho progresos significativos en el desarrollo de antivirales para el uso contra el VDVB, VFA y Herpes Virus.

El VDVB ha sido ampliamente estudiado como modelo para ensayos de antivirales humanos, especialmente VHC ya que son dos virus muy relacionados entre sí. Varios antivirales han demostrado tener eficacia *in vitro* [116]–[118] pero no han sido evaluados *in vivo*. Hoy en día, la única herramienta de control directa contra los patógenos virales disponibles para los veterinarios es el uso de vacunas, pero estas son a menudo insuficientes para evitar las infecciones por este virus en el campo, debido a la poca protección cruzada que inducen, el manejo inadecuado de las vacunas hasta su aplicación, la respuesta insuficiente por parte del individuo vacunado debido a malnutrición, sanidad, edad, preñez, etc. A esto se suma la ventana de inmunidad a la que exponen los animales hasta que se desarrolla la inmunidad adaptativa que, al tratarse de vacunas inactivadas, suele requerir de al menos dos aplicaciones.

Como se describiera más arriba, los IFN bovinos y humanos han sido evaluados frente al VDVB como antivirales en bovinos [112] [109], incluso para tratar infecciones [112]. El tratamiento con IFN- $\alpha$  humano no demostró ser efectivo y trajo aparejado el desarrollo de una anemia microcítica que cesó una vez suspendido el tratamiento [114]. Estos efectos podrían evitarse al usar IFN- $\lambda$ .

El uso adecuado de compuestos antivirales tiene el potencial de controlar la diseminación viral de forma rápida, limitando las pérdidas económicas y el sufrimiento animal [63]. Un estudio realizado por Newcomer y colaboradores [119] muestra que la administración profiláctica de un compuesto antiviral protege de la infección experimental a animales seronegativos. La aplicación de antivirales en grandes animales como medida profiláctica está aún en desarrollo, pero la posibilidad de poder usar este tipo de compuestos contra el VDVB es atractiva además de necesaria, sobre todo cuando se requiere una protección inmediata.

La aplicación práctica de antivirales contra el VDVB podría realizarse en diferentes etapas del proceso productivo. Se podría utilizar desde estadíos tempranos sobre todo en producciones lecheras en donde los terneros son estabulados en “guacheras” sufriendo situaciones de estrés que los predisponen a contraer VDVB y a desarrollar el complejo respiratorio bovino. El uso de antivirales puede ser efectivo en esta etapa para evitar que la enfermedad avance y los patógenos oportunistas empeoren el cuadro. En el caso de brotes de la enfermedad también se podrían aplicar antivirales para reducir la transmisión. La aplicación de antivirales podría realizarse durante maniobras que se llevan a cabo de rutina en la producción durante las vacunaciones, tacto, inseminaciones, castraciones, etc. En la producción lechera, por ejemplo, los animales tienen un contacto diario de hasta dos veces por día con los encargados que bien podrían suministrarles los tratamientos que hicieran falta.

## ANTIVIRALES COMO HERRAMIENTAS PARA DISMINUIR LA APLICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN SISTEMAS PRODUCTIVOS

La producción ganadera es uno de los sectores de más rápido crecimiento en los países en desarrollo, apoyada por el aumento en el número y tamaño de las explotaciones intensivas destinadas a aumentar la productividad. La intensificación a su vez ha incrementado el uso de antibióticos. La aplicación excesiva de antibióticos representa una amenaza para la salud humana, plantea barreras al comercio internacional y al mercado interno. En condiciones de producción intensiva, las infecciones virales son la principal causa de enfermedades bacterianas. Muchos virus, como el VDVB, conducen a un estado de supresión inmunológica que predispone a otras infecciones bacterianas favorecidas por un entorno de hacinamiento. La herramienta actual para prevenir infecciones virales en los rodeos bovinos es exclusivamente la vacunación. Sin embargo, las vacunas no están disponibles para muchas enfermedades virales, o bien no poseen las cepas emergentes, y no son efectivas en determinadas condiciones (por ejemplo, presencia de anticuerpos maternos). En el caso del VDVB, las vacunas inactivadas no inducen inmunidad protectora de manera inmediata.

En este escenario, controlar la propagación de infecciones virales reducirá la carga de enfermedades bacterianas y, por lo tanto, el uso de antibióticos. Atendiendo a este escenario, nuestra propuesta es utilizar el interferón recombinante bovino tipo III (IFN- $\lambda$ ) como un antiviral natural de amplio espectro para prevenir la propagación del virus dentro del hato, iniciando los estudios con el VDVB. La capacidad del IFN-III para estar activo en la ruta de entrada de la mayoría de los virus, sin afectar a otras células, lo hace atractivo para uso terapéutico.

---

## HIPÓTESIS

Las hipótesis de este trabajo son:

“El IFN- $\lambda$ 3 bovino posee actividad antiviral contra el VDVB”

“El IFN- $\lambda$ 3 bovino recombinante es un candidato para ser utilizado como bioterapéutico en infecciones con el VDVB”

---

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiviral del IFN- $\lambda$ 3 bovino frente al Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y determinar su potencial uso como bioterapéutico.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar y expresar IFN- $\lambda$ 3 e IFN- $\alpha$  bovinos en un sistema de expresión de mamíferos.
- Evaluar la actividad biológica de IFN- $\lambda$ 3 e IFN- $\alpha$  recombinantes con Virus de Fiebre Aftosa (VFA) y Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) y determinar su citotoxicidad sobre células *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK).
- Evaluar la actividad de IFN- $\lambda$ 3 e IFN- $\alpha$  recombinantes de inhibir la replicación de diferentes cepas de referencia y aislamientos locales del VDVB en células de origen bovino MDBK.
- Realizar una evaluación preliminar de la actividad del IFN- $\lambda$ 3 como antiviral para el tratamiento de las infecciones con el VDVB *in vivo*.



---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CÉLULAS Y CULTIVOS CELULARES

Las células de la línea *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK) de la *American Type Cell Collection* (ATCC®) fueron provistas por la Unidad de Cultivos de Células del Instituto de Virología de INTA Castelar. Como medio de mantenimiento se utilizó medio de cultivo mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (MEM-D, Gibco®, Invitrogen, Nueva York, US) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) certificado libre de genoma del VDVB (Internegocios S.A., Argentina) y antibióticos/antimicótico: 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B (Gibco®). El pasaje celular se realizó 1:5 dos veces por semana según el crecimiento celular, utilizando Tripsina-EDTA (Invitrogen®, California, US).

Las células primarias de Riñón Fetal Bovino (RFB) fueron preparadas por la Unidad de Cultivos de Células del Instituto de Virología de INTA Castelar siguiendo procedimientos ya estandarizados [120].

La línea celular MDBK-t2 gentilmente cedida por el Dr. Charleston [121], [122] están transfectadas de forma estable con una construcción que contiene el promotor humano del gen *Mx* río arriba de un gen reportero, el de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). La inducción de los genes *Mx* está regulada por los IFNs de tipo I y III. La expresión de CAT se cuantificó con el kit CAT-ELISA (Roche®, Basilea, Suiza). Las células MDBK-t2 fueron almacenadas en N<sub>2</sub> líquido en crioviales con 2 o 5 x 10<sup>6</sup> cél/ml (1 ml c/u). Una vez descongeladas fueron resuspendidas en el volumen de medio correspondiente: MEM-D (Gibco®) con 4,5 mg/lit de glucosa, GlutaMAX I, piruvato y suplementado con 10% SFB (Gibco®) y 10 mg/ml de Blastidina (Invitrogen®). Las células fueron pasadas 2 veces por semana en una dilución de 1:8, dependiendo del crecimiento celular, utilizando Tripsina-EDTA (Invitrogen®).

Para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se extrajeron aproximadamente 120 ml de sangre a un bovino sano en tubos Vacutainer® con EDTA para asegurar la esterilidad de la muestra. Se centrifugó a 1200 rpm a 4°C durante 45 minutos (min) en ángulo móvil y sin poner el freno. En la cabina de flujo laminar se extrajo la capa de leucocitos con pipeta Pasteur para luego resuspender en PBS 1X. Se colocó 6 ml de dicha suspensión muy suavemente y en un ángulo de 45° en varios tubos con 3 ml de Histopaque®1083 (Sigma®) cada uno. Se centrifugó a 800 xg durante 45 min a 4°C en ángulo móvil y sin freno. Luego se aspiró cuidadosamente con pipeta Pasteur la capa de CMSP de cada tubo evitando al máximo aspirar el Histopaque®. Se colectaron las CMSP en un cónico de 50 ml y para remover el Histopaque® se hicieron dos lavados resuspendiendo las CMSP en 50 ml de PBS y centrifugando a 300 xg durante 10 min a 4°C.

### VIRUS

Las cepas de referencia Singer y NADL fueron obtenidas de la ATCC®. El resto de las cepas forman parte del cepario del Instituto de Virología de INTA [21], [29], [123]–[126] que cuenta con 30 aislamientos Argentinos y 8 cepas de referencia del VDVB.

El Virus de Fiebre Aftosa (VFA) A-24 Cruzeiro [127] y el Virus de la Estomatitis Vesicular Bovina cepa New Jersey (VSV-NJ) [128] forman parte del Stock de INTA y fueron producidas en células BHK-21 y MDBK respectivamente.

## ANTICUERPOS

Para la tinción de las células infectadas con VDVB en la inmunofluorescencia directa se utilizó el anticuerpo policlonal de cerdo IgG anti-VDVB conjugado con FITC (VMRD<sup>®</sup>, Veterinary Medical Research & Development, USA). Los anticuerpos utilizados para el revelado del Western Blot fueron los siguientes: el policlonal de conejo anti-IL28B (Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, UK), el policlonal de cabra anti-IFN $\alpha$  (Abcam<sup>®</sup>) y el anticuerpo monoclonal anti-His (GE<sup>®</sup>, Chicago, USA). Para el ELISA en células: El anticuerpo monoclonal anti-NS3 fue amablemente cedido por el Dr. Gerrit Keizer (Prionics<sup>®</sup> AG, Zurich) y el anticuerpo conjugado utilizado fue el anti-ratón peroxidasa (KPL<sup>®</sup>, Sera Care, Milford, MA).

## ANIMALES

Para las pruebas que involucraron ratones, se usaron animales hembras de la cepa BALB/c, de 6 a 8 semanas de edad al comienzo del experimento y un peso de aproximadamente 18-20 gramos. Fueron mantenidos durante el experimento en el bioterio de INTA Castelar, en el rack ventilado con condiciones controladas de luz-oscuridad, temperatura y contacto con otros animales. Se les permitió a los animales aclimatarse, dándoles una semana de adaptación al nuevo ambiente antes de iniciar los experimentos. En todos los casos, los animales fueron controlados a diario para detectar y controlar posibles efectos adversos de los tratamientos y/o situaciones de estrés.

En la prueba de seguridad posológica se emplearon 12 bovinos (*Bos taurus*) del campo experimental de INTA Castelar. Los animales se distribuyeron al azar en los distintos grupos, cuidando la heterogeneidad de los mismos. Todos los animales estaban en buen estado corporal al inicio del experimento y eran seronegativos para VDVB.

Para el ensayo de efectividad en bovinos se utilizaron 6 hembras (*Bos taurus*) raza Holstein de 3 semanas de edad provenientes de un establecimiento lechero perteneciente al departamento de Salta Capital. Los animales fueron evaluados clínicamente para asegurarse que fuesen físicamente aptos.

Todos los protocolos que involucraron el uso de animales en instalaciones de INTA contaron con la aprobación del Comité de Ética y Bienestar Animal del Instituto de Virología de INTA. Protocolos CICUAE nro. 6/2017, 60/2017, 37/2018.

## EXTRACCIÓN DE ARN GENÓMICO

Las extracciones de ARN total se realizaron utilizando TRIzol (Invitrogen<sup>®</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células infectadas fueron cosechadas y se homogeneizaron con TRIzol durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregó cloroformo y se agitó de forma vigorosa durante 15 segundos (seg). Se incubó la muestra durante 2-3

min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 xg 15 min a 4°C. Se removió la fase acuosa de la muestra colocando el tubo a 45° y se colocó dicha fase en un tubo nuevo. Se agregó isopropanol 100%, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 12000 xg 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó con etanol 75%. La muestra se centrifugó nuevamente a 7500 xg durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante para luego dejar secar el *pellet* durante 5-10 min. El *pellet* se resuspendió en agua libre de ARNasa para finalizar el proceso con una incubación de 10-15 min a 55-60°C.

La calidad y la cantidad del ARN se determinó por medio de Nanodrop (NanoDrop2000 spectrophotometer, Thermo Scientific, Massachusetts, US). Se utilizaron únicamente aquellas muestras con índice a 260/280 nm entre 1.8-2.0 [129]. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

## DISEÑO DE LOS CEBADORES

Se diseñaron cebadores para amplificar la secuencia codificante del IFN- $\alpha$  (GenBank: NM\_001017411.1) y el IFN- $\lambda$ 3 bovino (GenBank: HQ317919.1), a partir de la secuencia del ARNm publicada, con el fin de expresarlos en un sistema eucariota basado en el vector pcDNA4/HisMax y pCDNA3 (Invitrogen®). Para ello, se agregaron sitios para enzimas de restricción en los extremos 5' de los cebadores para realizar el clonado direccionado en el vector elegido. Se controlaron los parámetros básicos de los cebadores en el software Primer3Plus.

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

## REACCIÓN DE RETRO-TRANSCRIPCIÓN (RT) Y PCR PARA LA OBTENCIÓN DE LOS ORF PARA LOS IFN BOVINOS

Para la obtención de ADN copia (ADNc) correspondiente a cada ORF se realizó una RT-PCR utilizando el kit OneStep RT-PCR (Qiagen®, Venlo, Holanda) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada reacción se utilizó 1  $\mu$ g del ARN genómico obtenido. Para corroborar la identidad de los fragmentos se realizó una digestión enzimática del producto de PCR con la enzima de restricción NcoI con el posterior envío del producto a la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología para ser secuenciado y confirmar su identidad. Las bandas correspondientes a IFN- $\alpha$  e IFN- $\lambda$ 3 fueron luego cortadas de un gel de agarosa preparativo y purificadas utilizando un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, GE).

## RT-QPCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE GENOMA VIRAL

La RT-qPCR viral fue realizada utilizando los cebadores Pan Pestivirus 324-326 [130] para amplificar un fragmento de 288 pares de bases (pb) de la región 5'UTR del VDVB. El ARN fue extraído a partir de los sobrenadantes de las células MDBK infectadas o sin infectar utilizando el Kit High Pure Viral RNA (Roche®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa fue llevada a cabo con 300 ng de ARN viral, el cebador reverso y la

Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega<sup>®</sup>, US) bajo condiciones estándar. La qPCR se llevó a cabo utilizando SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad<sup>®</sup>, California, USA). Se usó como referencia estándar un plásmido que contiene la secuencia de 288 pb de la región 5'UTR de la cepa NADL del VDVB. Las muestras y los controles fueron corridos por triplicado en el equipo IQ<sup>TM</sup>5 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad<sup>®</sup>) y analizados mediante el uso de BIO-Rad iQ5 2.0 Standard Edition Optical System Software.

## REACCIÓN DE RETRO-TRANSCRIPCIÓN (RT) PARA LA DETECCIÓN DEL 5'UTR DE PESTIVIRUS

El ARN fue extraído utilizando el Kit High Pure Viral RNA (Roche<sup>®</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la obtención de ADNc se utilizó la enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega<sup>®</sup>, US). Para cada reacción se utilizaron 500 ng de ARN viral y 200 ng de ARN genómico obtenido como se describe en el punto anterior, los cuales se mezclaron con 0,25 µg del cebador reverso (*Pan Pestivirus* 326) para el ARN viral y 0,2 µg de OligoDT (Biodynamics<sup>®</sup> SRL, Buenos Aires, Argentina) para el ARN genómico. Para la mezcla se agregaron 1 µl de solución de dNTP 10 mM (Promega<sup>®</sup>, US), 200 U de Transcriptasa Reversa, 5 µl de solución tampón de la enzima (20 mM Tris-HCL pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT y glicerol 50%), 20 U de inhibidor de ARNasa, cebador reverso 326 y OligoDT para ARN viral y ARN genómico respectivamente y agua ultra-pura (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, US) cantidad suficiente para (csp) 20 µl. El ARN se agregó en 5 µl de volumen final obteniendo así un volumen de reacción de 25 µl totales. Una vez obtenido el ADNc, se conservó a -20°C.

Para realizar la mezcla para la RT se mezclaron los cebadores correspondientes con la cantidad estimada de ARN en cada muestra para luego incubarla 5 min a 95°C e inmediatamente colocarla en hielo. Este procedimiento permitió que la unión de los cebadores se realice en la molécula de ARN extendida y no se formen estructuras secundarias que generen un pegado inespecífico. El conjunto de ARN-cebador se mezcló con los demás reactivos para completar la reacción. La mezcla se incubó a 42°C durante 60 min y luego a 95°C durante 5 min y el producto se refrigeró inmediatamente a 4°C.

## NESTED-PCR PARA LA DETECCIÓN DEL 5'UTR DE PESTIVIRUS

La amplificación mediante la técnica de nested-PCR se basó en el protocolo previamente descrito por Jones y col., 2001 [50]. Brevemente, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 µl. Se utilizaron 3 µl de solución tampón Taq 5X (750 mM Tris-HCl (pH 8.5), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20), 4 µl de Cl<sub>2</sub>Mg 25 mM, 1 µl de 300 nM de cada cebador (*Pan-Pestivirus Primers* 326 y 324), 0,3 µl de dNTPs 10 mM (Promega<sup>®</sup>), 0,2 µl de Taq DNA Polimerasa recombinante (Promega<sup>®</sup>) y agua Ultra-Pura csp 13 µl. Se sembraron 2 µl del producto de la reacción RT a la mezcla para completar los 15 µl de volumen final.

La amplificación se realizó en un termociclador convencional (Ivema SRL, Buenos Aires Argentina, modelo T-18). Como control negativo, en lugar de molde se utilizó una cantidad equivalente de agua Ultra-Pura. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una

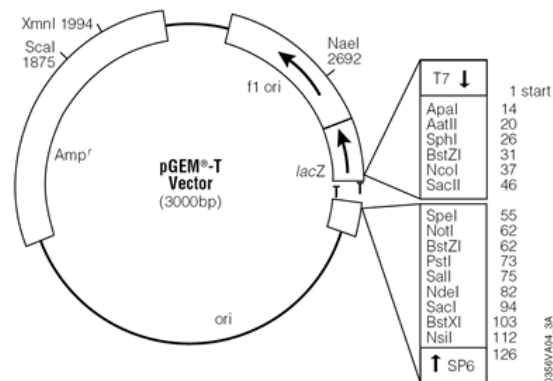
incubación a 94°C durante 3 min (paso de desnaturalización) y luego 35 ciclos de 15 seg a 92°C (desnaturalización), 20 seg a 56°C (unión o anillamiento) y 1 min a 72°C (elongación). Una vez finalizado el ciclado se incubó a 72°C durante 5 min para completar la elongación. El producto de esta reacción se conservó a 4°C.

La segunda ronda se llevó a cabo con un volumen final de 20 µl. Se utilizaron 4 µl de solución tampón Taq 5X, 4 µl de Cl<sub>2</sub>Mg 25 mM, 1 µl de 300 ηM de cada cebador (*Pesti-3* y *Pesti-4*), 0,4 µl de dNTPs 10 mM (Promega®), 0,2 ul de Taq DNA Polimerasa recombinante (Promega®) y agua Ultra-Pura csp 18 µl. Se sembraron 2 µl del producto de la reacción anterior a la mezcla para completar los 20 µl de volumen final.

La amplificación se realizó en un termociclador convencional (Ivema SRL, modelo T-18). Como control negativo, en lugar de molde se utilizó una cantidad equivalente de agua Ultra-Pura. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una incubación a 94°C durante 3 min (paso de desnaturalización) y luego 35 ciclos de 15 seg a 92°C (desnaturalización), 20 seg a 58°C (unión o anillamiento) y 40 seg a 72°C (elongación). Una vez finalizado el ciclado se incubó a 72°C durante 5 min para completar la elongación. Todos los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa 1,5% m/v e identificados de acuerdo a su tamaño por comparación con el marcador de peso molecular (Cien *Marker*, Biodynamics SRL).

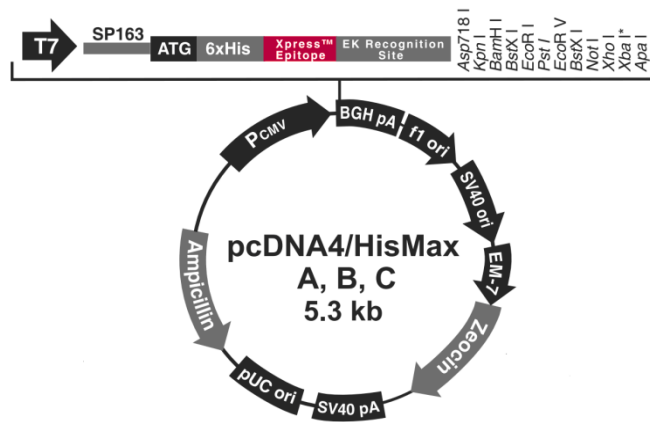
## CLONADO DE LAS SECUENCIAS CODIFICANTES PARA LOS INTERFERONES

Las secuencias correspondientes a IFN-α y λ3 fueron clonadas en pGEM-T (Promega®) (Figura M.1) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, con el producto de ligación se transformaron *E. coli* DH5α competentes, se seleccionaron las colonias que crecían en presencia de ampicilina y se obtuvieron los plásmidos utilizando un kit comercial (Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System, Promega®).



**Figura M1:** Representación esquemática de pGEM-T Easy vector (Promega®).

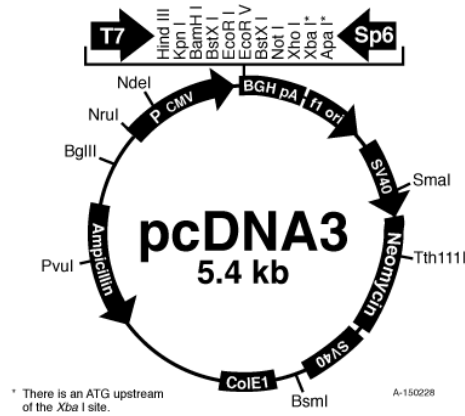
Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI para liberar el fragmento correspondiente al IFN- $\alpha$ ; y se utilizó NcoI que corta en la secuencia del IFN- $\lambda$ 3. Estas muestras fueron corridas en geles de agarosa al 0,8% m/v. Estas primeras digestiones enzimáticas se realizaron para seleccionar un clon positivo para cada IFN. El plásmido que contenía la secuencia para IFN- $\alpha$  fue digerido con XhoI -XbaI y el de IFN- $\lambda$ 3 con EcoRI-XbaI. Los productos de digestión fueron corridos en un gel preparativo (0,8% m/v). Las secciones (bandas) correspondientes a los interferones (IFNs) fueron cortados de los geles, purificados utilizando el kit Wizard SV Gel (Promega®) e incorporados en el vector pcDNA4/HisMaxA (Invitrogen®) (Figura M2) pre-digerido con las mismas enzimas según el producto a clonar.



**Figura M2:** Representación esquemática de pcDNA4/HisMaxA vector (Invitrogen).

El constructo se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,7% m/v. En el vector pcDNA4-HisMaxA los ORFs quedan bajo el promotor de CMV que permite expresar proteínas en células de mamíferos utilizando la ARN-Pol2. Por otro lado, el vector incorpora una secuencia codificante para 6 residuos de histidina “His-Tag” lo que facilitará luego la identificación y purificación de las proteínas. Las construcciones fueron secuenciadas nuevamente para corroborar la correcta inserción de las secuencias de interés.

Por motivos que serán detallados en la sección de “resultados” el IFN- $\lambda$ 3 debió ser clonado nuevamente libre de residuos de histidina. En este caso se utilizó el vector pcDNA3 (Invitrogen®) (Figura M3).



**Figura M3:** Representación esquemática de pcDNA3 vector (Invitrogen).

Se realizó una digestión del plásmido que contenía el IFN- $\lambda$ 3 ( $\rho$ GEM-T-IFN $\lambda$ 3) con EcoRI y XbaI (FastDigest, Thermo Scientific®), el producto de la digestión se corrió en un gel preparativo (agarosa al 0,8% m/v), se purificó la banda correspondiente con un kit comercial de GE Healthcare® (GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit) y se cuantificó en el Nanodrop (NanoDrop2000 spectrophotometer, Thermo Scientific®). Por otro lado se realizó la digestión del vector pcDNA3 con EcoRI y XbaI, se desfosforilaron los extremos 5' con Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Promega®), se cuantificaron en el Nanodrop y se realizó la ligación del vector con la secuencia de IFN- $\lambda$ 3. Con el producto de ligación se transformaron *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, se seleccionaron las colonias que crecían en presencia de ampicilina y se obtuvieron los plásmidos utilizando un kit comercial (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega®). Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI para liberar el fragmento correspondiente al IFN- $\lambda$ 3, los cuales fueron corridos en un gel de agarosa al 0,8% m/v para seleccionar un clon positivo para el sistema.

## EXPRESIÓN DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES

Para realizar las transfecciones en células HEK293T es necesario contar con gran cantidad de plásmido (concentración mínima 0,1 g/l), con alta pureza, por lo que se realizó una midiprep utilizando el kit Qiagen® Plasmid Midi Kit (#12143) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células HEK293T fueron sembradas en una placa de 10 mm a una concentración de  $2,4 \times 10^6$  cél/ml. Se colocaron 8  $\mu$ g del ADN a transfectar en un tubo de 2 ml con 300  $\mu$ l de MEM-D sin suero ni antibióticos. Se agitó suavemente para luego agregar 80  $\mu$ l del reactivo Polyfect (Qiagen®). Se resuspendió y se incubó durante 5-10 min a temperatura ambiente. Se le agregó 1 ml de medio MEM-D con 10% de SFB al tubo para luego adicionar todo el contenido a la monocapa celular. Se incubó durante 48 hs y se cosechó el sobrenadante. Se lo clarificó y almacenó a -80°C hasta su utilización.

## PAGE-WESTERN BLOT

Se verificó por Western Blot la correcta movilidad electroforética de los IFN recombinantes (IFNr). Diferentes muestras del sobrenadante clarificado, producto de las transfecciones en las células HEK293T, se corrieron en un gel de poliacrilamida 12% en condiciones reductoras. Fueron utilizados como controles negativos: pcDNA4/HisMaxA sin inserto, pcDNA3 sin inserto, células HEK293T sin transfectar. Control positivo de reactividad del Ac anti-HIS: proteína recombinante no relacionada derivada del Virus de la Fiebre Aftosa (rPVFA) que contiene 6 histidinas en su secuencia.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond™-P, GE Healthcare®). La transferencia se corroboró con una tinción con rojo Ponceau. Luego la membrana se bloqueó en PBS-Leche 5% durante toda la noche a 4°C. La membrana se dividió en varias secciones según el anticuerpo con el cual se desea revelar. De esta manera uno de los fragmentos de la membrana se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-Histidina hecho en ratón (GE Healthcare®) por 1 hora con agitación a 37°C (porción 1). Los otros dos fragmentos con un policlonal hecho en conejo anti-IL28B (Abcam®) y con el policlonal hecho en cabra anti-IFN $\alpha$  (Abcam®), porción 2 y 3 respectivamente. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se incubaron las membranas con un conjugado anti-ratón:peroxidasa (1:1000 para la porción 1), anti-conejo peroxidasa (1:750 para la porción 2) y anti-cabra:peroxidasa (1:750 para la porción 3) durante 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®, Massachusetts, US).

## CUANTIFICACIÓN DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES

La cuantificación del stock de los IFNr se hizo a partir de las MDBK-t2 que como se describió anteriormente están transfectadas con un plásmido que contiene el promotor humano del gen *MxA* asociado a un gen reportero de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). La inducción de los genes *Mx* está regulada por los IFNs de tipo I y III. La expresión de CAT se cuantifica con el kit de CAT-ELISA (Roche®). La cuantificación de los IFNr también se realizó mediante ensayos de reducción de la infección (se detallan más abajo).

El primer paso consistió en descongelar las MDBK-t2, luego se sembraron en placas de 12 pocillos (1 ml con 500000 cél/pocillo). Luego de 24 hs de incubación en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, se descartó el medio de cultivo y se lo reemplazó por 500  $\mu$ l de la muestra conteniendo la producción de IFNr a evaluar. Se realizó una incubación en estufa 20-24 hs más, se removió el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS 1X frío.

Finalizado esto se procedió a recolectar la muestra a procesar con el CAT-ELISA (Roche®) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se adicionaron 300  $\mu$ l/pocillo de buffer de lisis 1X (provisto por el kit) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. El contenido de cada pocillo fue recolectado en tubos de 1,5 ml y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min con el fin de clarificar los extractos celulares. Se colocaron 200  $\mu$ l/pocillo del estándar de enzima CAT en diferentes diluciones para confeccionar una curva de calibración, así como los 200  $\mu$ l de muestra (extracto celular) que también se colocaron por pocillo para realizar la determinación. Se cubrió la placa y se incubó durante 1 hora a



37°C. Se removió el contenido de los pocillos, se lavó 5 veces con 250 µl/pocillo de buffer de lavado (provisto por el kit) y se agregó 200 µl/pocillo de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD). Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y se realizó la lectura de las absorbancias a 405 nm. Los resultados fueron normalizados respecto a la concentración de proteínas.

## PREPARACIÓN DE STOCKS VIRALES

Se inició la producción de stocks virales y su titulación para poder evaluar la capacidad de los IFNr de inhibir la replicación de diferentes cepas correspondientes a aislados locales y de referencia del VDVB.

Los stocks virales de VDVB se produjeron utilizando monocapas de células MDBK con un 70% de confluencia. Para las infecciones se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 DITC50/ml. El inóculo viral se diluyó en 1 ml de medio MEM-D comenzando la infección en un frasco plástico para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> "T25" (Sigma®). Se realizó una primera incubación a 37°C con movimiento orbital durante una hora para permitir la adsorción del virus a la célula. Posteriormente, se agregó 4 ml de medio de mantenimiento (MEM-D, 2% de SFB) y se incubó a 37°C en estufa con 5% CO<sub>2</sub> durante 72 hs. La disrupción de las células remanentes se realizó mediante un ciclo de congelamiento-descongelamiento a -80°C, seguido de clarificación por centrifugación a 4000 xg a 4°C por 20 min. El sobrenadante se fraccionó y se almacenó a -80°C.

Para la amplificación de cada cepa se realizaron 2 pasajes ciegos en células MDBK en botellas T75. En una primera etapa se adsorbió cada virus con una MOI de 0,1 y se realizó una incubación durante 72 hs en una estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, realizándose la disrupción de las células remanentes con un ciclo de congelamiento-descongelamiento como fue indicado previamente. El contenido del frasco de cultivo clarificado se separó en 2 alícuotas que se utilizaron como inóculos para infectar de la misma forma 2 botellas T150 conteniendo una monocapa de células MDBK con 70% de confluencia. Luego de realizar el mismo procedimiento que en el primer pasaje se fraccionó la suspensión viral (clarificado) en alícuotas de 1 ml que se conservaron a -80°C. Los cultivos de células MDBK infectadas con los biotipos no citopáticos se cosecharon a la par con los biotipos citopáticos y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. Para conocer el título de los stocks virales se utilizó la técnica de microtitulación en placa con células MDBK, para esto se realizaron diluciones seriadas en base cuatro de las muestras analizadas y luego de 5 días de incubación a 37°C, se realizó inmunofluorescencia directa (IFD) (descrita en el siguiente punto) para visualizar la presencia de cepas NCP utilizando un anticuerpo policlonal anti-VDVB conjugado a FITC (VMRD®). Paralelamente, se realizó la observación directa de la monocapa en microscopio óptico para la detección de ECP de las cepas CP del VDVB. Los títulos fueron calculados utilizando el método de Reed y Muench [131] y expresados en dosis infectivas de cultivo de tejido 50 (DITC50/ml).

## INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

Todas las infecciones en monocapas celulares realizadas con cepas NCP se detectaron mediante la técnica de IFD. Para ello, las células se fijaron a las placas de cultivo de 96 pocillos utilizando paraformaldehído (PFA) al 3% en PBS durante 15 min. El siguiente paso consistió en permeabilizar la monocapa utilizando Tritón X100 (Sigma®) al 0,2% en PBS y después de dos lavados la placa se incubó durante 10 min con una solución de bloqueo con suero normal equino al 5% y 3% de azul de Evans como contra-tinción. Las placas se incubaron con un anticuerpo comercial policlonal anti-VDVB conjugado con FITC (VMRD®) a una dilución de uso 1:1 en solución de bloqueo, empleando 30 µl de volumen total por pocillo. Se incubó en cámara húmeda durante 45 min a 37°C. Se lavó 2 veces por 5 min con PBS 1X. La lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia invertido con el objetivo de 40X utilizando el filtro FICT/Evans *Blue* (490/575 nm respectivamente). Se consideró positiva toda muestra en la cual se observó fluorescencia verde brillante citoplasmática. Todos los ensayos que utilizaron IFD fueron realizados con control positivo de infección.

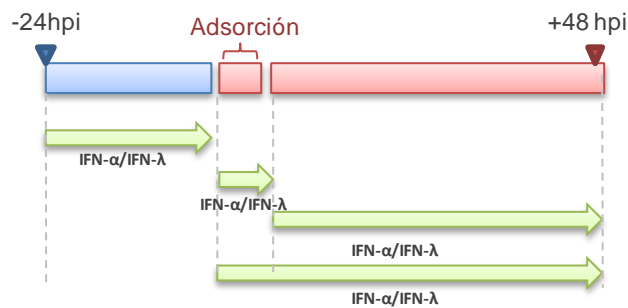
## ENSAYO DE REDUCCIÓN DE FORMACIÓN DE PLACAS

La actividad antiviral de los IFNr fue determinada mediante la reducción del número de focos virales. Brevemente, las células MDBK fueron pre-tratadas con diluciones al medio de dichos compuestos. Luego de 24 horas de incubación se removieron los sobrenadantes, se lavaron las células y se desafiaron con aproximadamente 100 unidades formadoras de placas (UFP) de VSV, VFA o cepas CP del VDVB durante 1 hora. El inóculo fue removido, se realizó un lavado con PBS estéril 1X y se cubrió la monocapa con agarosa al 2%. Se realizó una incubación de 48 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> 5%. Cada tratamiento fue realizado por triplicado y en cada ensayo se incluyeron dos controles: el virus solo (sin tratamiento con IFNr) o las células sin tratar (sin virus ni IFNr), también por triplicado. Las placas se visualizaron mediante la tinción con Cristal Violeta. La base para el control negativo (células infectadas sin tratar) fue el promedio del número de placas virales + el desvío estándar de las células sin tratar. El porcentaje de la reducción (PR%) comparado con el control negativo fue calculado de la siguiente manera:  $PR(\%) = (V - I) \times 100 / V$ . Donde V es el promedio del número de placas para el control negativo (células infectadas sin tratar) e I corresponde al promedio del número de placas en los pocillos tratados con IFNr. El número de UFP fue proporcionalmente disminuyendo a medida que aumentaba la concentración de IFNr.

## ENSAYO DE TIEMPO DE ADICIÓN

Se realizó el tratamiento con IFNr realizando las incubaciones a diferentes tiempos: pre-tratamiento con IFNr de 24 hs, tratamiento con IFNr de 1 hora durante la adsorción viral, tratamiento con IFNr de 1 hora durante la adsorción viral y la posterior incubación de 48 hs hasta la finalización del ensayo y el tratamiento con IFNr durante 48 hs luego de finalizada la adsorción. Para esto se sembraron células MDBK (15000 cél/pocillo) en una placa de 96 pocillos y se realizaron los siguientes tratamientos (Figura M4):

- “Pre-Tratamiento”: Pre-tratamiento de 24 hs con IFN- $\alpha$  y  $\lambda$ 3 en una dilución única de 1/20.
- “Adsorción”: Tratamiento con IFN- $\alpha$  y  $\lambda$ 3 en una dilución única de 1/20 durante la hora de adsorción del inóculo viral
- “Adsorción + Tratamiento”: Tratamiento con IFN- $\alpha$  y  $\lambda$ 3 en una dilución única de 1/20 desde el inicio de la adsorción hasta el final del ensayo que requiere 48 hs de incubación.
- “Tratamiento”: Tratamiento con IFN- $\alpha$  y  $\lambda$ 3 en una dilución única de 1/20 desde que finaliza la adsorción hasta el final del ensayo que requiere 48 hs de incubación.



**Figura M4.** Esquema de tratamiento a diferentes tiempos con IFN- $\alpha$  e IFN- $\lambda$ 3.

La infección se realizó con la cepa de referencia Singer (CP) a una MOI de 0,5. Se incubó el inóculo durante 1 hora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (Adsorción). Se lavaron todos los pocillos con MEM-D, según el diseño de placa se colocó 100  $\mu$ l/pocillo de MEM-D al 2% SFB o el IFN correspondiente, IFN- $\alpha$  o  $\lambda$ 3 según el tratamiento. Se incubó 48 hs y se recolectó el sobrenadante para realizar una microtitulación en placa de 96 pocillos según el ECP.

## ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

### ESTUDIO DE VIABILIDAD POR CRISTAL VIOLETA

Esta técnica se utilizó para el estudio del efecto de los IFNr sobre la viabilidad de células adherentes. Para realizar dicho estudio células MDBK se sembraron en placas de 96 pocillos hasta alcanzar la confluencia y se expusieron a las distintas concentraciones de los IFNr durante 24 hs a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Una vez finalizada la incubación se levantó el sobrenadante y se colocó PFA-4% 100  $\mu$ l/pocillo o 1,5 ml/pocillo según se trate de una placa de 96 o 6 pocillos respectivamente. Se incubó durante 10 min. Se retiró el fijador y se colocó cristal violeta 0,1% y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se retiró el cristal violeta, se lavó dos veces con H<sub>2</sub>O corriente y se dejó secar la placa de forma invertida. Se tomaron registros fotográficos y luego se agregó metanol 100  $\mu$ l/pocillo o 1,5 ml/pocillo, según si era una placa de 96 o 6 pocillos respectivamente, para

solubilizar el cristal violeta. Se realizó la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm.

### ESTUDIO DE ACTIVIDAD METABÓLICA POR XTT

La actividad metabólica de las células MDBK pre-tratadas con IFNr fue medida con TACS® XTT Cell proliferation Assay Kit (TREVIGEN, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las sales de tetrazolio de segunda generación, XTT, se pueden usar eficazmente en ensayos de proliferación celular, citotoxicidad y apoptosis. En las células vivas, el XTT se reduce a un derivado naranja soluble. La sensibilidad de un ensayo de XTT se mejora en gran medida por el uso de un portador de electrones intermedio, PMS (N-metil dibenzopirazina metil sulfato). PMS ayuda a impulsar la reducción de XTT y la formación de su derivado de formazán.

Los valores de Densidad Óptica (DO) para los controles de células sin tratar (utilizando sobrenadantes de transfecciones realizadas con el plásmido vacío) fueron computados como referencia de células viables. Las células muertas se obtuvieron a partir de la infección con la cepa Singer del VDVB a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 e incubando las células a 45°C en medio sin suero durante 24 horas. En algunos experimentos la muerte celular se logró mediante shock osmótico, lavando la monocapa con agua destilada. Los ensayos fueron realizados por triplicado y la Concentración Inhibitoria 50 (CI50) fue estimada por una regresión no-lineal como el número de unidades de IFNr necesarias para la reducción del 50% del efecto citopático sobre las células MDBK infectadas no tratadas.

### CÁLCULO DE PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD

A partir de las DO obtenidas para los estudios de viabilidad celular y/o actividad metabólica se calcula el porcentaje de toxicidad con la siguiente fórmula:

*Citotoxicidad (%) = 100 x [(A-B)/B]* siendo "A": Promedio DO células no tratadas, y "B": Promedio DO células tratadas.

El Índice de Selectividad (IS) es el resultado del cociente entre la concentración de citotoxicidad 50 (CC50 – concentración de compuesto que produce un 50% de citotoxicidad) y la Concentración Efectiva 50 (CE50).

### **DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS/NECROSIS EN CMSP**

Las CMSP, preparadas como se describió anteriormente fueron resuspendidas con 3-5 ml de Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) sin rojo fenol (Gibco®) suplementado con: Hepes 1M (Sigma®), antibióticos, glutamina (Sigma®), Piruvato (Gibco®), 2β-mercaptoetanol (Sigma®) y SFB 10% (Gibco®).

Luego de realizado el tratamiento correspondiente las células fueron cosechadas y se procedió a la marcación con el Kit de Annexin V y 7-AAD (BD Pharmingen™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se lavaron las células dos veces con PBS 1X y se ajustó su concentración a 1x10<sup>6</sup> cél/ml. Se transfirió 100 µl de la suspensión de células a un tubo nuevo de citometría. Se agregaron 5 µl de los reactivos: PE Annexin V y 7-AAD

provistos por el kit. Se agitó suavemente y se incubó en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se agregaron 400 µl de *Binding Buffer* 1X y se realizó el análisis correspondiente en el citómetro (BD FACS Calibur™) de INTA Castelar.

## ELISA EN CÉLULAS

Se trabajó con células MDBK en placas de 96 pocillos a una confluencia aproximada del 70% ( $1,5 \times 10^3$  células/pocillo) [132], las células fueron pre-tratadas con diferentes diluciones al medio de los IFNr (~6 a 0,1 U/ml) o con medio de cultivo MEM-D (control) e incubadas a 37°C durante 24 hs. Finalizado el período de incubación, las células se lavaron e infectaron con 50 µl de las diferentes cepas del VDVB a una MOI=0,05 para las cepas CP y 0,001 para las NCP. Las MOI fueron pre-seleccionadas para arrojar un valor de DO de  $1,10 \pm 0,14$  a las 48 hs post-infección. A los pocillos sin infectar utilizados como controles se les adicionó MEM-D sin suero. La adsorción viral se realizó en estufa de 37°C durante 1 hora, posteriormente las células fueron lavadas e incubadas 48 hs más. Cada tratamiento y controles fueron realizados por triplicado. Finalizado el tiempo de incubación las células se fijaron con PFA-4%, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 10% y fueron bloqueadas con suero normal equino (SNE) al 10% durante 90 min. Para el revelado, las células se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal anti-NS3 (1 hora a 37°C), luego se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón-peroxidasa (2 hs a temperatura ambiente). Luego de 3 lavados con PBS 1X se agregó el sustrato ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) diamonio (ABTS), se incubó 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con fluoruro de sodio (NaF) 0,5 M y se realizó la lectura en un espectrofotómetro (Multi-Mode Microplate Reader, Synergy HT, BioTek®) a 405 nm. Los resultados se normalizaron al número de células en cada pocillo con Janus Green (Sigma®, 50 µl/pocillo), realizando una segunda lectura a 595 nm y dividiendo ambas lecturas de DO para obtener el valor corregido.

Los protocolos para determinar la actividad antiviral de la Thiosemicarbazona derivada de 5,6-Dimethoxy-1-Indanone (TSC) y el Phenyl thiophene carboxamide derivado 12 (PTC12), gentilmente provistos por la Dra. Cavallaro y el Dr. Álvarez, respectivamente; fue realizado como de ha reportado anteriormente [116], [117]. Brevemente, diluciones seriadas al medio de TSC (desde 10 µM) fueron agregadas a las células luego de remover el inóculo viral (VDVB-NADL, MOI=0,05). Diluciones seriadas al medio de PTC12 (desde 10 µM) fue agregado a las células junto con el virus (VDVB-VS253, MOI=0,001) e incubado durante 72 hs.

## INFECCIONES CON VDVB-GFP

Se utilizaron células MDBK en placas de 24 pocillos con una confluencia del 80%. Se realizaron dos lavados con 500 µl de PBS/pocillo. Luego se agregaron 50 µl en cada pocillo de virus recombinante (cepa NADLncp) que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) durante la traducción de los genes tempranos del ARN viral (virus "VDVB-GFP", provisto por el Dr. Diego Álvarez de la UNSAM). El inóculo viral se adicionó a una MOI=0,1 y se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalizada la incubación se hizo un lavado con 500 µl de

MEM-D 2% SFB por pocillo, se descartó y se agregaron 1 ml/pocillo de MEM-D 2% SFB. Se incubó 3-5 días hasta el momento de la cosecha viral.

Por otro lado, para la obtención de CMSP, detallado más arriba, se centrifugó 120 ml de sangre de un bovino sano a 800 xg a temperatura ambiente durante 45 min. Se aspiraron cuidadosamente las CMSP y se van colocando en un cónico estéril de 50 ml. Se realizaron lavados con PBS 1X y medio RPMI-2% SFB, finalmente se resuspendieron las células con medio RPMI completo. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células por pocillo en una placa de 48 pocillos. Al día siguiente se realizó un lavado suave con 200  $\mu$ l/pocillo de PBS 1X. Se agregó el VDVB-GFP a una MOI=2 y se incubó 1 hora a 37°C. Se lavó con MEM-D SFB 2% y luego se agregaron 500  $\mu$ l/pocillo de MEM-D 2% SFB para ser incubado durante 3-5 días.

## PRE-TRATAMIENTO CON INTERFERONES E INFECCIÓN DE CMSP

Para la obtención de CMSP de bovino se siguió el mismo procedimiento descrito más arriba. Se sembraron  $3 \times 10^6$  cél/pocillo en una placa de 6 pocillos. Se realizó un pre-tratamiento de 24 hs con IFN $\alpha$  en una dilución de 1/8. Finalizada la incubación se infectó con la cepa de VDVB 98-124 a una MOI=0,2. Se realizó la adsorción del inóculo viral durante 1 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se lavó con medio RPMI y se colocó 2 ml/pocillo de medio RPMI 2% SFB en todos los pocillos. También se emplearon controles de infección sin tratar y controles de células sin infectar ni tratar. Se incubó 48 hs en estufa y se recolectaron los sobrenadantes para determinar NS3 mediante el ELISA en células.

## PUESTA A PUNTO MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR VDVB

### PREPARACIÓN DE STOCKS VIRALES PARA LA INFECCIÓN

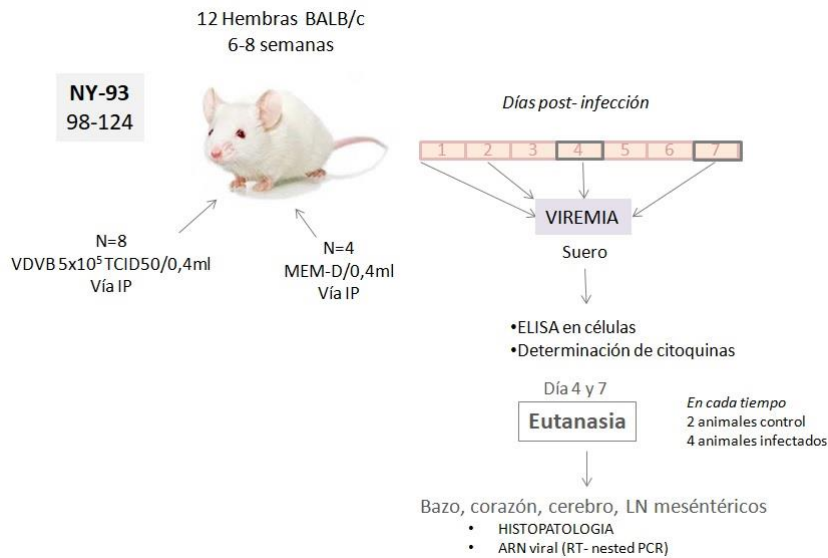
Para la puesta a punto del modelo murino de infección se inocularon ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad con las cepas del VDVB: NY-93 (cepa de referencia, alta virulencia) y 98-124 (aislado local, baja virulencia). Para tal fin se prepararon nuevos stocks virales siguiendo el mismo procedimiento antes detallado, pero con la salvedad de realizar la amplificación viral sin utilizar SFB para evitar una posible reacción adversa al inyectar el inóculo en los ratones.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Dos grupos de 8 ratones BALB/c (hembras, 6-8 semanas de vida) fueron inoculados por vía intraperitoneal (ip) con 0,4 ml de una dosis de  $5 \times 10^5$  DITC50/ml de dos cepas del VDVB (NY-93 y 98-124). Cuatro animales fueron empleados como control sin infectar y recibieron 0,4 ml de MEM-D. (Protocolo N° 6/2017 CICUAE).

Se utilizaron dos cepas no citopáticas del VDVB de genotipo II, la cepa de referencia NY-93 y el aislado local 98-124, de alta y baja virulencia, respectivamente. Ambas cepas han sido ya caracterizadas por nuestro grupo en un modelo bovino, mostrando diferencias en la severidad de la signología clínica y la extensión de la viremia [133]. Se obtuvieron muestras de sangre y suero de los ratones al iniciar el experimento y a los 2, 4 y 7 días post infección (dpi). A los 7 dpi se practicó la eutanasia del total de los animales y se realizó la ablación

de corazón, bazo, hígado, riñón, linfonódulos mesentéricos y cerebro para evaluar presencia de genoma viral por RT-nested PCR y detectar lesiones histopatológicas en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Se cuantificaron también citoquinas pro-inflamatorias a los 2 y 4 dpi en suero utilizando kit comercial (BD® CBA inflammation kit) y se determinó viremia utilizando el ELISA en células descrito anteriormente (Figura M5).



**Figura M5.** Esquema del diseño experimental del desarrollo del modelo murino de infección para las cepas NY-93 y 98-124 del VDVB.

## INFECCIÓN DE ESPLENOCITOS DE RATÓN

Una vez obtenido el bazo del animal se lo colocó en una placa de petri estéril con 5 ml de medio RPMI, se realizaron dos pequeñas incisiones y se disgregó el órgano con la ayuda de dos porta-objetos con una porción de vidrio esmerilado. La suspensión celular obtenida fue recolectada con una aguja 21G acoplada a una jeringa de 5 ml y se realizaron 3 pasajes por este sistema para terminar de desmenuzar el tejido. Se completó un volumen final de 15 ml con medio RPMI suplementado con glutamina, antibiótico,  $\beta$ -Mercaptoetanol y SFB (Gibco®) al 10%. Se contaron las células haciendo diluciones con Solución de Turk y se sembraron 1x10<sup>6</sup> cél/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se incubó durante 16 hs para luego realizar la infección con la cepa 98-124 (Aislamiento local, baja virulencia, NCP) a una MOI=2. Se incubó 48 hs y se levantó el sobrenadante para luego determinar NS3 y citoquinas pro-inflamatorias.

prueba de eficacia en ratones

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trabajó con 8 grupos de ratones, hembra, BALB/c de 6-8 semanas de vida. Los tratamientos realizados en cada grupo fueron los siguientes (Protocolo N° 6/2017 CICUAE) (Figura M6):

**Grupo 1a:** Día -1: Pre-tratamiento con IFN- $\alpha$  mouse (Miltenyi Biotec<sup>®</sup>, Alemania) 250000 U/dosis, vía SC. Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. (n=5)

**Grupo 1b:** Día -1: Pre-tratamiento con IFN- $\lambda$  mouse (Sigma<sup>®</sup>) 2ug/dosis, vía SC. Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. (n=5)

**Grupo 2a:** Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. Día 1: Tratamiento con IFN- $\alpha$  (Miltenyi Biotec<sup>®</sup>) 250000 U/dosis, vía SC. (n=5)

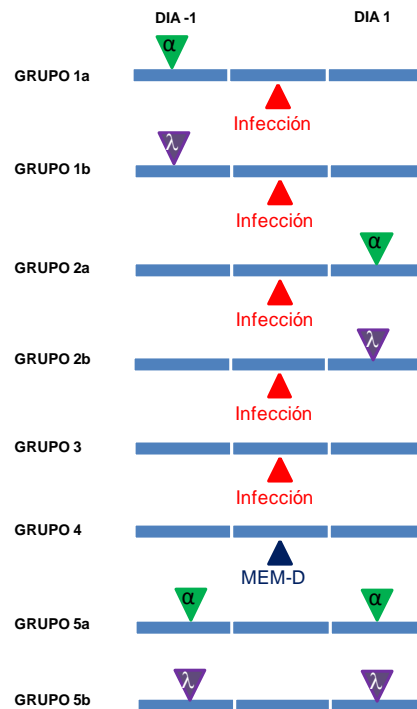
**Grupo 2b:** Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. Día 1: Tratamiento IFN- $\lambda$  mouse (Sigma<sup>®</sup>) 2ug/dosis, vía SC. (n=5)

**Grupo 3:** Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. (Control positivo de infección). (n=5)

**Grupo 4:** Día 0: Inoculación de 0,4 ml de MEM-D (excipiente del inóculo viral) por vía IP. (Control negativo). (n=6)

**Grupo 5a:** Día -1 y 1: Administración de IFN- $\alpha$  (Miltenyi Biotec<sup>®</sup>) 250000 U/dosis, vía SC. (Control de tratamiento). (n=2)

**Grupo 5b:** Día -1 y 1: Administración de IFN- $\lambda$  mouse (Sigma<sup>®</sup>) 2ug/dosis, vía SC. (Control de tratamiento). (n=2)



**Figura M6.** Esquema de diferentes tratamientos según el diseño experimental del ensayo.



Toma de muestras: Todos los procedimientos con ratones se llevaron siempre a cabo en la estación de cambiado del bioterio de INTA Castelar (Foto M1). Se tomaron muestras de sangre entera los días 0, 4, 7, 12, 20, 30, 40, 50 y 60 post infección (pi). Se colectó un volumen máximo de 100  $\mu$ l por tiempo de sangrado para no afectar la volemia del animal. La sangre entera se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. La eutanasia se realizó a los 60 dpi administrando una previa anestesia con isoflurano para luego proceder a la dislocación cervical. Posteriormente se realizó la extracción del bazo, hígado y linfonódulos mesentéricos. A partir de las muestras de sangre se realizó la determinación de viremia en suero mediante el ELISA en células detallado anteriormente. A partir de las muestras de los diferentes órganos se realizó el aislamiento viral.



**Foto M1.** Trabajo con ratones BALB/c en la estación de cambiado del bioterio de INTA

### AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE ÓRGANOS

El primer paso consistió en el macerado de los órganos: Se agregó una pizca de arena estéril y se disgregó la muestra utilizando pilones plásticos aptos para tubos de 1,5 ml y se fue agregando MEM-D 5% de SFB (volumen final: 1 ml). Luego, se centrifugó el macerado a 10000 xg durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el *pellet* y se volvió a centrifugar el sobrenadante en las mismas condiciones. Se descartó el *pellet* nuevamente y se sembraron 50  $\mu$ l de sobrenadante por cuadruplicado en una placa de 96 pocillos conteniendo una monocapa de células de MDBK. Se incubó 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  en estufa con 5% de  $\text{CO}_2$ . Se agregó 50  $\mu$ l de MEM-D 5% de SFB a cada pocillo y se incubó durante 2 días en las condiciones descriptas anteriormente. Finalizado el tiempo de incubación se realizó un ciclo de congelado-descongelado de las placas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para hacer pasajes ciegos en placas de 96 pocillos. Se realizaron en total 3 pasajes ciegos y luego se determinó la presencia viral mediante el revelado con IFD.

## PRUEBA DE EFICACIA EN RATONES – TRATAMIENTO COMBINADO

Se trabajó con 7 grupos de ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad que recibieron los siguientes tratamientos (Protocolo N° 6/2017 CICUAE) (Figura M7):

**Grupo 1:** Día -2, -1: Pre-tratamiento con IFN- $\alpha$  mouse (Miltenyi Biotec®) 250000 U/dosis, vía SC. Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. Día 1 y 2: Tratamiento con IFN- $\alpha$  mouse (Miltenyi Biotec®) 250000 U/dosis, vía SC. (n=5)

**Grupo 2:** Día -2, -1: Pre-tratamiento con IFN- $\lambda$  mouse (Sigma®) 2ug/dosis, vía SC. Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. Día 1 y 2: tratamiento con IFN- $\lambda$  mouse (Sigma®) 2ug/dosis, vía SC. (n=2)

**Grupo 3:** Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. Día 1 y 2: Tratamiento con IFN- $\alpha$  mouse (Miltenyi Biotec®) 250000 U/dosis, vía SC. (n=5)

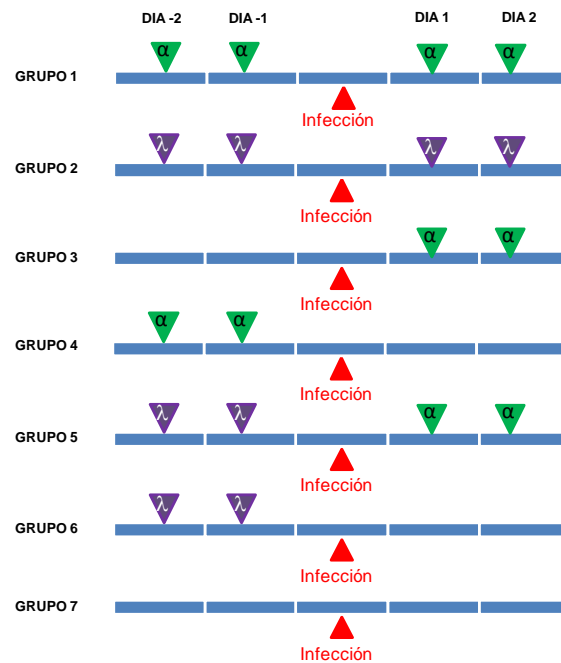
**Grupo 4:** Día -2, -1: Pre-tratamiento con IFN- $\alpha$  mouse (Miltenyi Biotec®) 250000 U/dosis, vía SC. Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. (n=5)

**Grupo 5:** Día -2, -1: Pre-tratamiento con IFN- $\lambda$  mouse (Sigma®) 2ug/dosis, vía SC. Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. Día 1 y 2: Tratamiento con IFN- $\alpha$  mouse (Miltenyi Biotec®) 250000 U/dosis, vía SC. (n=5)

**Grupo 6:** Día -2, -1: Pre-tratamiento con IFN- $\lambda$  mouse (Sigma®) 2ug/dosis, vía SC. Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. (n=5)

**Grupo 7:** Día 0: Inoculación de 0,4 ml de  $5 \times 10^5$  DITC50 de VDVB cepa 98-124 vía IP. (n=5)

Se tomaron muestras de sangre los días: 0, 2, 4, 7, 10, 15, 20 y 30 pi. A partir de la sangre obtenida se determinó la viremia en suero mediante el ELISA en células detallado anteriormente.



**Figura M7.** Esquema de diferentes tratamientos según el diseño experimental del ensayo.

## PRUEBA DE SEGURIDAD POSOLÓGICA EN BOVINOS

Se trabajó con 12 bovinos Aberdeen Angus, hembras, de 3 meses de edad pertenecientes al campo experimental de INTA Castelar (Protocolo N° 60/2017 CICUAE).

Los animales fueron divididos de forma aleatoria en 4 grupos experimentales con un n=3 en cada uno. Los grupos 1, 2 y 3 recibieron dos inoculaciones subcutáneas (SC) de sobrenadante de transfecciones conteniendo IFN- $\lambda$ 3 recombinante bovino en tabla del cuello con un intervalo posológico de 24 hs y dosis de 6 U/Kg, 3 U/kg y 1,5 U/kg respectivamente, en un volumen de 16 ml [134]. El grupo 4 control recibió solamente el excipiente (MEM-D) en el mismo volumen y sitio de inyección que los grupos anteriores. Se realizó un seguimiento clínico y se tomaron muestras de sangre entera y suero de vena yugular de cada animal los días 0, 3 y 8 post-inoculación para controlar los siguientes parámetros: Hematocrito, Recuento de Glóbulos Rojos y Blancos, Plaquetas, Hemoglobinemia, Volumen Corpuscular Medio, Hemoglobina Corpuscular Media, Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media, Uremia, Creatinina, GPT, GOT, GT $\gamma$ , Fosfatasa Alcalina, Proteínas Totales, Albúmina, Bilirrubina Total y Directa [112], [133]. (Foto M2)



**Foto M2.** (A) Aplicación SC de IFN- $\lambda$ 3 en tabla del cuello. (B) Toma de muestra de sangre entera mediante punción de vena yugular.

## PRUEBA DE EFICACIA EN BOVINOS

Se utilizaron 6 bovinos hembra de la raza Holstein de 3 semanas de edad al inicio del ensayo, con un peso vivo promedio de 54,5 Kg, provenientes del establecimiento lechero “Santa Elena” ubicado en la Capital de la Provincia de Salta. (Protocolo N° 37/2018 CICUAE).

La primera maniobra realizada fue la extracción de muestras de sangre periférica mediante punción de la vena yugular de 22 animales del establecimiento para determinar la presencia de antígeno p80 y de Anticuerpos contra p80 en suero. De esta manera se seleccionaron 6 animales negativos para ambas determinaciones.

Se emplearon dos grupos de tamaño diferente (Grupo 1 y Grupo 2 control). Aceptando un riesgo alfa de 0,1 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral, se precisan 4 sujetos en el primer grupo (Grupo 1) y 2 en el segundo (Control) para detectar una diferencia igual o superior a 0,8 unidades. Se asume que la desviación estándar común es de 0,3. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%.

Los animales fueron separados al azar en los 2 grupos: El grupo 1 recibió 6 U/Kg/día por vía subcutánea (sc) de IFN- $\lambda$ 3 recombinante en tabla del cuello (Foto M3) durante 2 días antes de la infección (pre-tratamiento, días -2 y -1 pi), el día 0 fue el día de la infección la cual será detallada más adelante y el día 1 y 2 pi se administró nuevamente 6 U/Kg/día por vía subcutánea (sc) de IFN- $\lambda$ 3 recombinante en tabla del cuello (tratamiento). A los animales del grupo control se les administró los días -2, -1, 1 y 2 pi MEM-D 2%SFB (excipiente del IFN- $\lambda$ 3 recombinante) y también se los infectó el día 0 de la misma manera que al grupo experimental.

## INSTALACIONES

Los terneros se alojaron en un campo experimental de la provincia de Salta. La supervisión de los animales la realizaron veterinarios de la estación experimental INTA Cerrillos. Se mantuvieron estabulados bajo la modalidad de “guachera con estaca” en 7 mt<sup>2</sup>/animal (Foto M4 y 5).

Se trabajó bajo el “principio de las cinco libertades”: ausencia de hambre y sed, ausencia de incomodidad física y térmica, ausencia de dolor, enfermedades y lesiones, posibilidad de mostrar una conducta normal y ausencia de miedo y distrés (es decir, estrés intenso o duradero que sobrepasa la capacidad de adaptación del animal). Para asegurar el cumplimiento de este principio se estableció un protocolo de alimentación y bebederos que aseguraban el consumo *ad libitum* de agua. Asimismo, se realizó estrictamente un examen periódico en busca de afecciones y se intentó generar una familiarización entre el animal y el investigador para reducir el estrés.



**Fotos M4 y 5.** Instalaciones del campo experimental. Terneros estabulados en “guachera con estaca”.

## ALIMENTACIÓN

Se alimentó a los animales con alimento balanceado iniciador para terneros “Teknafeed Guachera 35%” (Teknal S.A., Argentina) (Composición en tabla M1). Se ofreció desde el primer día *ad libitum* mediante tarro (foto M6).



**Foto M6.** Cría bajo el sistema de “estaca”. Alimentación y agua ad libitum.

COMPOSICIÓN DEL ALIMENTO	
Proteína cruda	37,50%
Calcio	3,62%
Potasio	1,59%
Magnesio	0,73%
Sodio	0,70%
Fósforo	0,68%
Hierro	364 ppm
Zinc inorgánico	285 ppm
Zinc orgánico	159 ppm
Cobre inorgánico	93,7 ppm
Cobre orgánico	47,9 ppm
Selenio inorgánico	1 ppm
Ionóforo	140 ppm
Antibiótico	63,9 ppm
Vitamina A	10315 UI/KG
Vitamina AD3	2064 UI/KG
Vitamina E	47 UI/KG

**Tabla M1.** Composición alimento “Teknafeed Guachera 35%”.

### INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Todas las infecciones experimentales se realizaron utilizando 5 ml de medio de cultivo con una concentración final de  $1 \times 10^6$  DITC50/ml de VDVB cepa 98-124. Las inoculaciones del virus se realizaron por la vía nasal utilizando un aspersor manual.



**Foto M3.** Inoculación de IFN- $\lambda$ 3 recombinante por vía SC

## SEMIOLÓGÍA DEL TERNERO INFECTADO, SCORE CLÍNICO (SC) Y TOMA DE MUESTRAS

Una vez infectados, los terneros fueron examinados de forma periódica en búsqueda de signos clínicos asociados al VDVB. Se realizó una inspección visual, un examen objetivo general y particular que comprendió la evaluación de constantes fisiológicas, estado de mucosas y auscultación de la región torácica para descartar la presencia de anomalías pulmonares que puedan relacionarse con la infección. Se tuvo en cuenta también las condiciones climáticas al momento de la examinación. La temperatura rectal se tomó con termómetro digital Citizen® Digital Silfab 301c con alarma de alerta y la auscultación se realizó con el estetoscopio Littmann® Lightweight li S.e. 2450.

Para clasificar los signos clínicos se diseñó un sistema de puntaje o score clínico (SC) para poder comparar terneros entre sí.

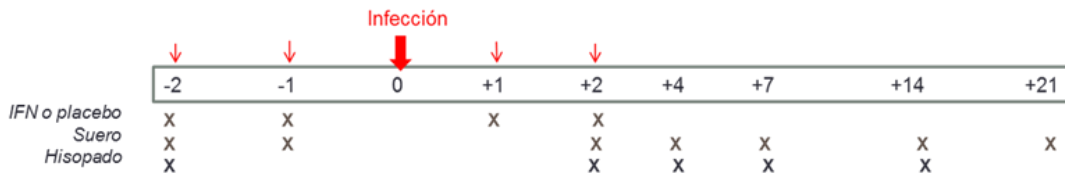
El SC abarcó la evaluación del sensorio, presencia de anorexia, evaluación de secreciones nasales y oculares y presencia y tipo de diarrea [133]. La Tabla M2 detalla el diseño del puntaje o score según cada signo.

Signo	Categoría	Score o Puntaje
Sensorio	Alerta	0
	Deprimido	1
	Rta. Sólo a estímulos dolorosos	2
Anorexia	Ausente	0
	Presente	1
Secreción Nasal	Serosa	1
	Seromucosa	2
	Mucopurulenta	3
Secreción Ocular	Serosa	1
	Seromucosa	2
Diarrea	Leve	1
	Media	2
	Acuosa	3
	c/sangre (Melena o Hematoquecia)	4
Signos Respiratorios	Tos	1
	Disnea	2

**Tabla M2.** Descripción de los signos clínicos evaluados y su puntaje asignado.

Se tomó muestra de sangre entera los días: -2, -1, 4, 7, 14, 21 pi mediante punción de vena yugular para luego realizar las determinaciones en suero. También se realizaron hisopados nasales los días: -2, 2, 4, 7 y 14 pi (figura M8).

Luego del dosaje de anticuerpos y viremia el día 24 pi y corroborando la sanidad de los animales, éstos pudieron regresar a su establecimiento de origen. La cepa 98-124 con la que se inoculó a los animales es de baja virulencia. La sintomatología que presenta es leve y de total remisión transcurridos 4 a 5 días post-infección [133]. Previendo tal situación y al no ser necesaria la toma de muestras de órganos de los animales, acordamos con el establecimiento de origen la devolución de los terneros una vez culminada la experiencia.



**Figura M8. Prueba de eficacia en bovinos.** Esquema de tratamiento, infección y toma de muestra a los diferentes días post-infección.

## AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE HISOPADO NASAL

Los hisopados nasales se realizaron con tampones de algodón estériles previamente embebidos con MEM-D suplementado con antibióticos y antifúngicos. Se colocó un tampón por animal en una de sus fosas nasales durante por lo menos 5 minutos. Al retirar el tampón se lo colocó en un cónico de 50 ml y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min para obtener una muestra homogénea para luego determinar NS3 mediante el Kit de ELISA de Ag para VDVB (Priocheck®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## ANÁLISIS DE DATOS

La dosis Inhibitoria 50% en los IFNr fue computada usando el modelo inhibición-respuesta en GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, CA, USA). En este estudio, los valores de DO fueron estandarizados en DO~1 para las células infectadas, luego, DI50 corresponde a las unidades que dieran DO~0,5. El rango lineal de detección de este método permite la estimación de cada valor DI50 sin tener que realizar una dilución de punto final.

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el GraphPad Prism v5.0. Se aplicó el test de Spearman para medir la extensión de qué valores de DO estimadas por el ELISA en células y la lectura de otros métodos, tienden a cambiar en forma conjunta cuando las células MDBK fueron pre-tratadas con diferentes concentraciones de cada IFN. Los resultados de la sensibilidad de las diferentes cepas fueron comparados con ANOVA 2-



factor repeated measurements seguido de Test de Bonferroni de comparaciones múltiples. El intervalo de confianza fue del 95%.

Las comparaciones entre grupos, que en todos los casos no tenían una distribución normal, se realizó utilizando la prueba de Mann-Whitney.

El intervalo de confianza fue del 95% para todas las evaluaciones realizadas.

---

## RESULTADOS - CAPÍTULO 1

### DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE INTERFERONES RECOMBINANTES

#### OBJETIVOS

- Clonar y expresar IFN- $\lambda$ 3 e IFN- $\alpha$  bovinos en células de mamíferos.
- Evaluar la actividad biológica de IFN- $\lambda$ 3 e IFN- $\alpha$  recombinantes con virus de conocida susceptibilidad.
- Determinar el efecto de los IFN $\alpha$  sobre la viabilidad celular de las MDBK.

#### INTRODUCCIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El primer paso de este trabajo de tesis consistió en el clonado de las secuencias que codifican para los IFN- $\lambda$ 3 e IFN- $\alpha$  bovinos. Basándonos en el trabajo de Díaz-San Segundo y col [111] y a partir de la secuencia ya publicada para ambas citoquinas: IFN- $\alpha$  bovino (GenBank: NM\_001017411.1) y el IFN- $\lambda$ 3 bovino (GenBank: HQ317919.1) se diseñaron los cebadores. Los pasos básicos para esta etapa fueron en primer lugar la obtención del material genético “molde” (ARNm) a partir del cual se obtuvo el ADN copia (ADNc), para luego amplificar la secuencia codificante (ORF) por PCR. Luego se llevó a cabo el clonado de ambos ORF y el posterior sub-clonado para introducir la secuencia en un plásmido que permita la expresión de la proteína recombinante en un sistema de células de mamífero. Una vez corroborado que la proteína se expresaba correctamente, evaluamos su actividad biológica frente a un virus de sensibilidad conocida [111]. Por otro lado, contamos con un sistema que permite evaluar la actividad de los IFNs sobre el promotor Mx utilizando un sistema reportero.

#### RESULTADOS

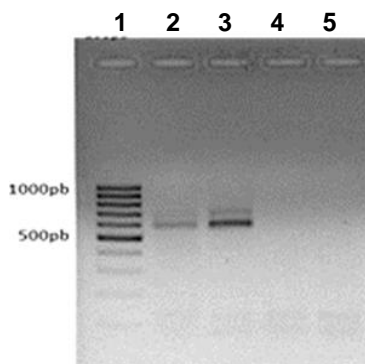
##### CLONADO DE LOS ORF DE LOS INTERFERONES $\alpha$ Y $\lambda$ 3 BOVINOS Y VERIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS

Se realizó el diseño de los cebadores para amplificar el ORF que codifica para el IFN- $\alpha$  (GenBank: NM\_001017411.1) y el IFN- $\lambda$ 3 bovino (GenBank: HQ317919.1). Los cebadores utilizados y sus características se describen en la Tabla 1.1.

Nombre	Longitud	PM	Tm°	nmol	GC %	Secuencia
<b>Fw-λ3</b>	28	8550	84.9	54.9	64.2	<b>CAGAATTC</b> ATGGCCCCGGGCTGCACGCT
<b>Rw-λ3</b>	30	9158	74.4	42.0	53.3	T <b>CTAGATT</b> AGACACACTGGTCTCCGCTGGC
<b>Fw-α</b>	29	8857	90.3	47.3	75.8	CCG <b>CTCGAGAT</b> GGCCCCGGGCTGCACGCT
<b>Rw-α</b>	30	9096	86.1	67.8	70	T <b>CTAGAGACC</b> AGGTGTGTGTCTCAGTCC

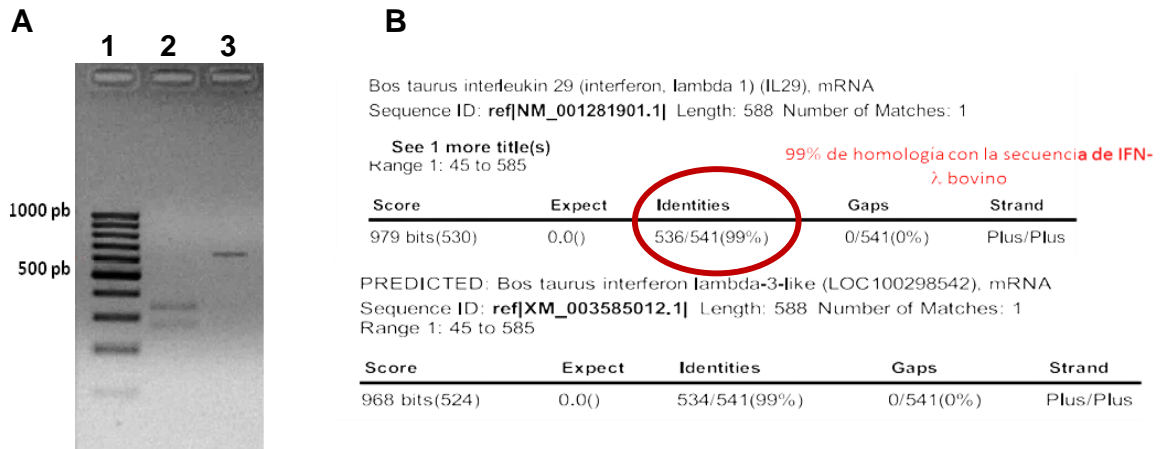
**Tabla 1.1. Cebadores utilizados para amplificar las secuencias codificantes de los IFN-α y λ3 bovinos.** Se indica en **negrita** los sitios para las enzimas de restricción elegidas para realizar el clonado.

Se extrajo ARN total de células de Riñón Fetal Bovino (RFB) infectadas con VFA cepa A24 Cruzeiro (MOI=0.2) utilizando Trizol, según se detalla en “Materiales y métodos”. La concentración del ARN extraído se determinó utilizando un Nanodrop (NanoDrop2000® spectrophotometer, Thermo Scientific). Con los cebadores diseñados, se realizó una retro-transcripción para obtener los ADNc correspondientes a cada ORF. Para el caso de IFN-λ3, en un primer intento se obtuvo ADNc inespecífico debido a la temperatura de anillado de la RT-PCR, la cual fue modificada de 55 a 60°C. Una vez establecida la temperatura correcta se realizó la amplificación de ambas secuencias (Figura 1.1).

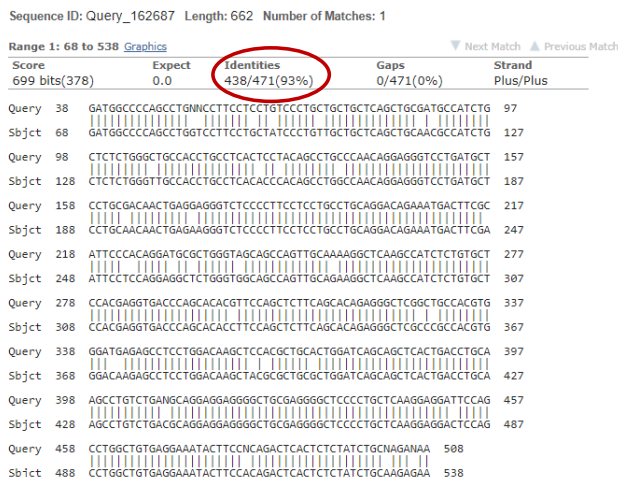


**Figura 1.1. Gel de Agarosa 1,8% de los productos de la RT-PCR.** Se observan dos bandas, una de ~588 pb que corresponde al ORF del IFN-λ3 y otra de ~662 pb, que corresponde a IFN-α según se indica. Se corrieron también los controles negativos de la PCR (utilizando el agua de dilución en lugar del ADNc). Calle 1: Ladder 100pb (Biodynamics SRL); 2: IFN-λ3, 3: IFN-α; 4 y 5: control negativo.

Al haber resultado algo laborioso este primer paso de RT-PCR particularmente para el IFN-λ3 (por la variante en su temperatura de anillado), antes de enviar la muestra a secuenciar decidimos primero corroborar la identidad del fragmento correspondiente al IFN-λ3 realizando una digestión enzimática del producto de PCR con NcoI (Figura. 1.2 A) y se obtuvieron fragmentos esperados de aproximadamente 266 y 326pb. Una vez corroborada la digestión enzimática se enviaron a secuenciar los amplicones de PCR para confirmar su identidad tanto para IFN-λ3 como para α (Figura 1.2 B y 1.3). La digestión enzimática no se realizó con el producto de IFN-α.

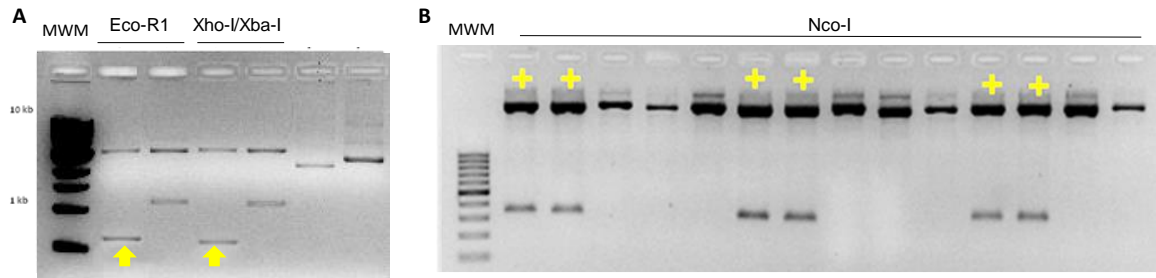


**Figura 1.2. Evaluación del amplicón correspondiente al ORF para IFN-λ bovino. (A)** Gel de Agarosa al 1,8% donde se muestra del producto digestión del amplicón para IFN-λ sin digerir y digerido con NcoI, según se indica. Se observan los productos de la digestión, dos fragmentos de ~ 266 y 326 pb. **Calle 1:** Ladder 100pb (Biodynamics SRL); **2:** IFN-λ digerido con enzima de restricción NcoI; **3:** IFN-λ sin digerir. **(B)** Resultado del análisis de la secuencia del amplicón y su identidad por homología en GeneBank .



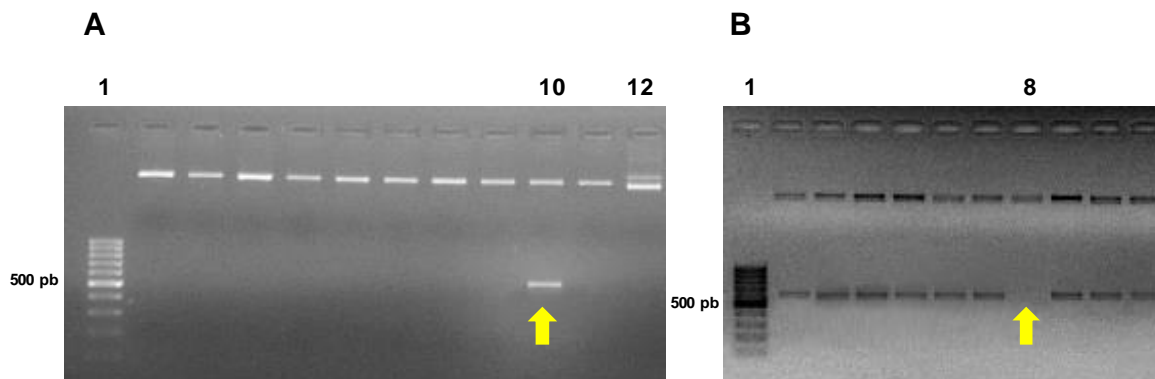
**Figura 1.3. Evaluación del amplicón correspondiente al ORF para IFN-α bovino. Se realizó un BLAST con la secuencia obtenida a partir del análisis del producto de RT-PCR para IFN-α bovino y se obtuvo un fragmento con un 93% de homología con la secuencia de referencia.**

Las bandas correspondientes a IFN-α e IFN-λ fueron luego cortadas de un gel de agarosa preparativo, purificadas utilizando un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, GE) y luego clonadas en pGEM-T (Promega). Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción, según se tratara de IFN-α o λ, para seleccionar los clones positivos que incorporaron el fragmento correspondiente. Se utilizó EcoRI y XhoI-XbaI para IFN-α; y se utilizó NcoI que corta en la secuencia del IFN-λ (ver más arriba). Estas muestras fueron corridas en geles de agarosa al 0,8% m/v. (Figura 1.4 A, B).



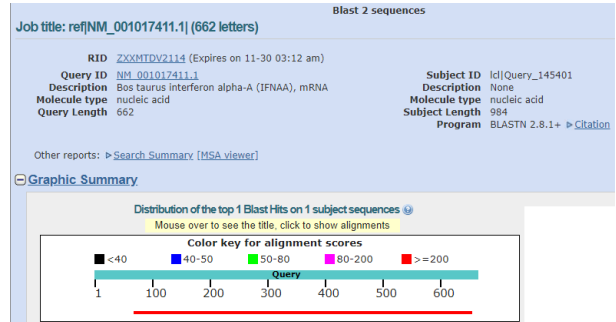
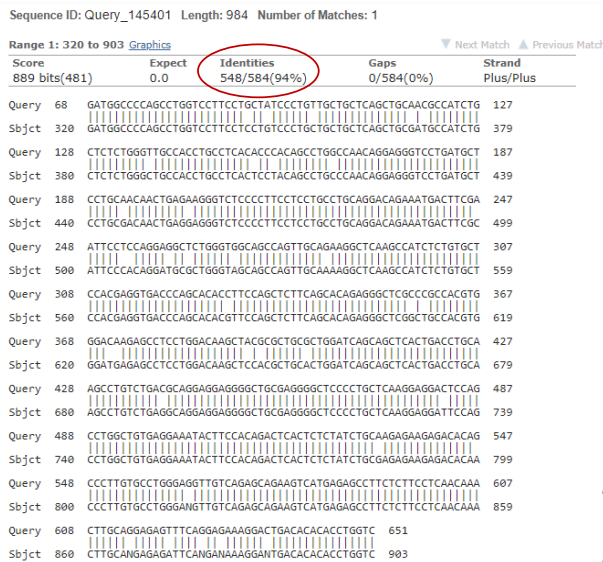
**Figura 1.4. Búsqueda de colonias positivas (screening).** Clonado de los amplicones correspondientes para los ORF de IFN- $\alpha$  (A) e IFN- $\lambda$ 3 (B) en pGEM-T easy vector. Los plásmidos purificados de las bacterias resistentes a penicilina (agente de selección) fueron digeridos con las enzimas que se indican. Se indican fragmentos del tamaño esperado y los clones positivos encontrados. MWM: marcador de peso molecular “100bp Ladder (Biodynacics SRL)”.

Las secuencias clonadas en pGEM-T fueron subclonadas en el vector pcDNA4-HisMaxA (Invitrogen®). En este vector, los ORFs quedan bajo el promotor de CMV que permite expresar proteínas en células de mamíferos utilizando la ARNPol2. Por otro lado, el vector incorpora una secuencia codificante para 6 residuos de histidina “Poli-His” que permite la identificación y purificación de las proteínas. De esta manera, una vez seleccionados los plásmidos que incorporaron correctamente los fragmentos correspondientes a IFN- $\alpha$  o  $\lambda$ 3 los mismos fueron digeridos con las enzimas de restricción: XhoI-XbaI para IFN- $\alpha$  y EcoRI-XbaI para IFN- $\lambda$ 3. Los productos de digestión fueron corridos en un gel preparativo (0,8% m/v). Las secciones (bandas) correspondientes a los IFNs fueron extraídas de los geles e incorporados en el vector pcDNA4-HisMaxA pre-digerido con las mismas enzimas según el producto a clonar. Los constructos se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1,7% m/v donde volvieron a seleccionarse los clones positivos que incorporaron los fragmentos de IFN- $\alpha$  o  $\lambda$ 3. (Figura 1.5 A y B).

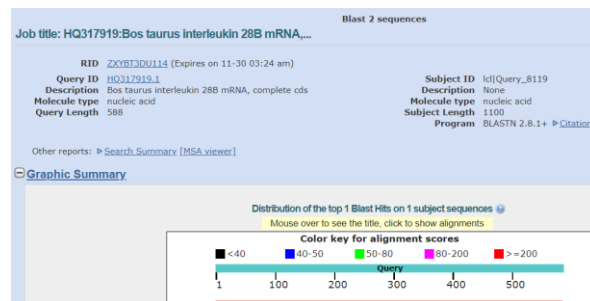
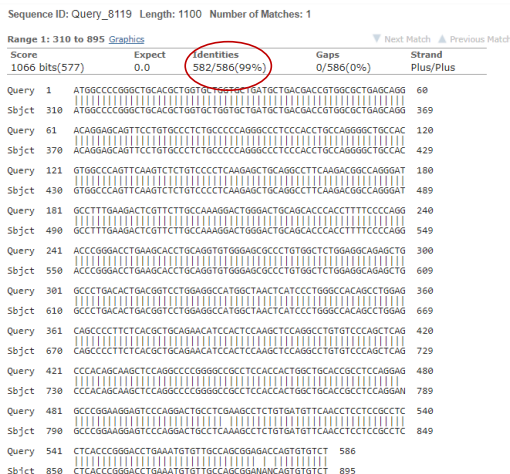


**Figura 1.5. Verificación de constructos que incorporaron IFN- $\alpha$  e IFN- $\lambda$ :** (screening). Clonado de los amplicones correspondientes para los ORF de IFN- $\alpha$  (A) e IFN- $\lambda$ 3 (B) en pCDNA4HisMaxA. Los plásmidos purificados de las bacterias resistentes a penicilina (agente de selección) fueron digeridos con las enzimas: XhoI-XbaI para IFN- $\alpha$  y EcoRI-XbaI para IFN- $\lambda$ . (A) Calle 1: Ladder 100pb (Biodynacics SRL); 10: indicado con flecha clon positivo, plásmido digerido con XhoI-XbaI que libera inserto de ~662 pb; 12: plásmido sin digerir. (B) Calle 1: Ladder 100 pb (Biodynacics SRL); 8: indicado con flecha el único clon negativo que no libera el fragmento. El resto libera inserto de ~588 pb.

Las construcciones fueron secuenciadas nuevamente. No se encontraron mutaciones ni deleciones. (Figura 1.6 y 1.7).



**Figura 1.6. Verificación de la secuencia correspondiente a IFN- $\alpha$  clonada en pcDNA4HisMaxA.** El fragmento liberado por el clon seleccionado positivamente a partir de la digestión del plásmido con las enzimas de restricción XhoI-XbaI fue secuenciado y analizado. En la figura se muestra el BLAST donde se observa un 94% de identidad con la secuencia de referencia publicada en el Gene Bank.



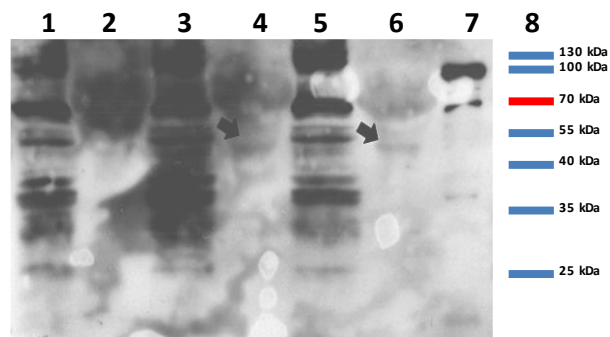
**Figura 1.7. Verificación de la secuencia correspondiente a IFN- $\lambda$ 3 clonada en pcDNA4HisMaxA.** El fragmento liberado por el clon seleccionado positivamente a partir de la digestión del plásmido con las enzimas de restricción EcoRI-XbaI fue secuenciado y analizado. En la figura se muestra el BLAST donde se observa un 99% de identidad con la secuencia de referencia publicada en el Gene Bank.

## EXPRESIÓN DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES BOVINOS

### EVALUACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES

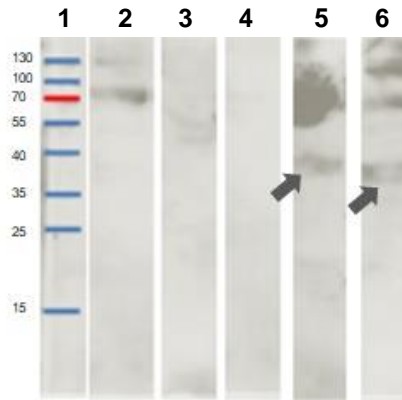
Una vez realizadas las diferentes construcciones y habiendo corroborado la secuencia de los ORF evaluamos la correcta movilidad electroforética de las proteínas expresadas, para luego determinar si conservaban sus propiedades funcionales. Los plásmidos pcDNA4HisMaxA conteniendo las secuencias clonadas de los ORF de IFN- $\alpha$  y  $\lambda 3$  bovinos fueron transfectados en células HEK293T utilizando lípidos catiónicos (PolyFect®) siguiendo el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos. En este sistema la expresión de los genes clonados se realiza desde el promotor de CMV.

Luego de la transfección, se recogieron por separado los pellets y sobrenadantes a las 48 horas y se corrieron en SDS-PAGE 12%. Se sembró en cada gel aproximadamente entre 2-4  $\mu\text{g}$  de proteínas totales de cada preparación (cuantificadas en Nanodrop). Se corrió el SDS-PAGE y luego se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa a fin de evaluar la reactividad con un anticuerpo comercial anti-HIS. Las proteínas expresadas por ambos plásmidos se visualizaron mejor en los sobrenadantes de células transfectadas a las 48 hs luego de la transfección. Estos polipéptidos fueron reconocidos por el anticuerpo anti-HIS y poseían el peso molecular esperado:  $\sim 45$  y  $41$  kDa para IFN- $\alpha$  e IFN- $\lambda 3$ , respectivamente (Figura 1.8). Los resultados obtenidos indican que los vectores construidos pueden expresar y secretar eficientemente los interferones recombinantes (IFNr) bovinos.



**Figura 1.8: SDS-PAGE 12% WB con los productos de expresión de la transfección de células HEK293T con pCDNA-HISmaxA conteniendo el ORF de IFN- $\alpha$  o de IFN- $\lambda 3$  recombinantes bovinos.** Los WB se revelaron con un anticuerpo anti-HIS, seguido de conjugado anti-ratón/peroxidasa y quimioluminiscencia (ECL). Referencias-calles: 1- Pellet plásmido vacío; 2-Snte. Plásmido vacío, 3- Pellet IFN- $\lambda$ , 4: Snte. IFN- $\lambda$ , 5: Pellet IFN- $\alpha$ , 6: Snte. IFN- $\alpha$ , 7- Proteína conteniendo HIS (control de reactividad del anticuerpo), 8: dibujo que marca la ubicación del marcador de peso molecular.

En una segunda corrida electroforética se sembraron únicamente 1µg de proteínas totales de los sobrenadantes de transfección, pudiendo verificar claramente las bandas correspondientes a IFN-α y λ (Figura 1.9).



**Figura 1.9. Expresión de los IFN-α y λ recombinantes bovinos en los sobrenadantes de células HEK293T.** Las células HEK293T fueron transfectadas con pcDNA4HisMaxA-α o λ. Los sobrenadantes de transfección fueron recolectados a las 48 hs y 20µl de cada sobrenadante conteniendo 1ug de proteínas totales fueron sembrados en SDS-PAGE seguido de WB. Calle 1: Marker Page Ruler (Fermentas-kDa), 2: control positivo de transfección, que fue revelado con un suero de conejo anti-E2 seguido por un conjugado anti conejo-peroxidasa. Calle 3: sobrenadantes de células HEK293T sin transfectar; 4: sobrenadantes de células HEK293T transfectadas con pcDNA4HisMaxA sin inserto; 5: indicado con una flecha, sobrenadante de células HEK293T transfectadas con pcDNA4HisMax-α y 6: indicado con una flecha, sobrenadante de células HEK293T transfectadas con pcDNA4HisMax-λ. Las líneas 1,3,4,5 y 6 fueron reveladas con un anticuerpo monoclonal anti-HIS seguido por anti-ratón peroxidasa para luego revelar por quimioluminiscencia con ECL.

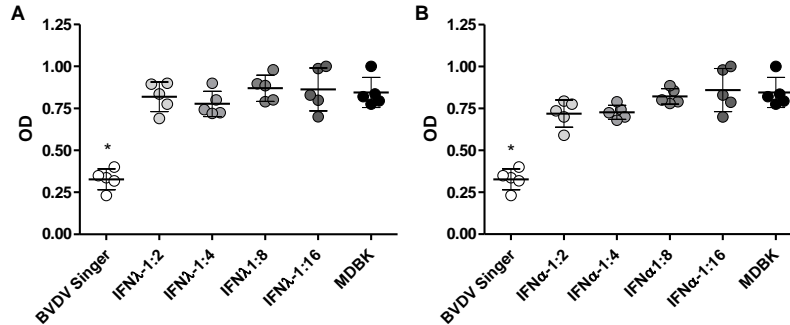
## EFFECTO DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Esta reportada la toxicidad que pueden presentar los IFN $\alpha$  sobre ciertas células, es por eso que antes de evaluar su potencial efecto antiviral debimos corroborar la ausencia de efectos adversos sobre las líneas celulares con las que se iba a trabajar. Uno de los virus en los que está reportada la actividad de los IFN-α y λ es el VFA, que replica en células BKH-21. El primer ensayo realizado sobre estas células reveló una altísima toxicidad sobre las mismas, probablemente debido a su origen ya que son células de hámster. Decidimos entonces trabajar exclusivamente con células bovinas.

La línea celular utilizada para amplificar el VDVB es MDBK, que es una línea de células epiteliales de riñón bovino. Para el ensayo de toxicidad, realizamos diluciones seriadas al medio de los sobrenadantes de las células HEK293T transfectadas con los vectores de



expresión. Cada dilución fue adicionada sobre la monocapa de células MDBK y las células fueron incubadas durante 24 hs a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Este ensayo no mostró diferencias significativas entre los valores de DO de las células MDBK no tratadas y aquellas que fueron incubadas durante toda la noche con las distintas diluciones de cada IFNr (Figura 1.10).



**Figura 1.10: Efecto de los IFNr sobre la viabilidad de las células MDBK.** Determinación de los valores de DO a partir del tratamiento de células MDBK con diluciones de las preparaciones conteniendo los IFNr. (A) IFN- $\alpha$ , (B) IFN- $\lambda$ 3. Las células fueron teñidas con cristal violeta que posteriormente fue solubilizado. Se incluye control de células no tratadas e infectadas con VDV CP Ceba Singer (MOI=2, 72 hpi).

Con los valores de DO obtenidos estimamos el porcentaje de toxicidad para cada IFNr sobre las células MDBK, como se explica en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.2. Las concentraciones más altas evaluadas, que corresponden a diluciones al medio del stock producido, arrojaron un porcentaje de citotoxicidad inferior al 50% para ambos IFNr, siendo de aproximadamente 17% para IFN- $\alpha$  y del 3% para el IFN- $\lambda$ 3. Al no alcanzarse el 50% de toxicidad, no fue posible estimar el índice de selectividad para estos IFNr. Los resultados fueron similares para células de RFB (no se muestra). Estos resultados demuestran la ausencia de citotoxicidad en los IFNr evaluados y su excelente seguridad para ser utilizados en ensayos *in vitro*.

A	TRATAMIENTO				
	IFN $\lambda$ -1:2	IFN $\lambda$ -1:4	IFN $\lambda$ 1:8	IFN $\lambda$ -1:16	NO TRATADAS
	0,84	0,92	0,90	0,99	0,84
	0,89	0,74	0,89	0,80	0,79
	0,78	0,72	0,79	1,00	0,78
	0,69	0,80	0,98	0,70	1,00
	0,90	0,90	0,80	0,83	0,82
PROMEDIO	0,82	0,82	0,87	0,86	0,85
Citotoxicidad (%)	3,17	3,40	-2,90	-2,06	

B	TRATAMIENTO				
	IFN $\alpha$ 1:2	IFN $\alpha$ -1:4	IFN $\alpha$ 1:8	IFN $\alpha$ -1:16	NO TRATADAS
	0,74	0,72	0,86	0,79	0,84
	0,79	0,74	0,89	0,98	0,79
	0,78	0,70	0,79	1,00	0,78
	0,59	0,68	0,78	0,70	1,00
	0,70	0,79	0,80	0,83	0,82
PROMEDIO	0,72	0,73	0,82	0,86	0,85
Citotoxicidad (%)	17,52	16,19	2,77	-1,65	

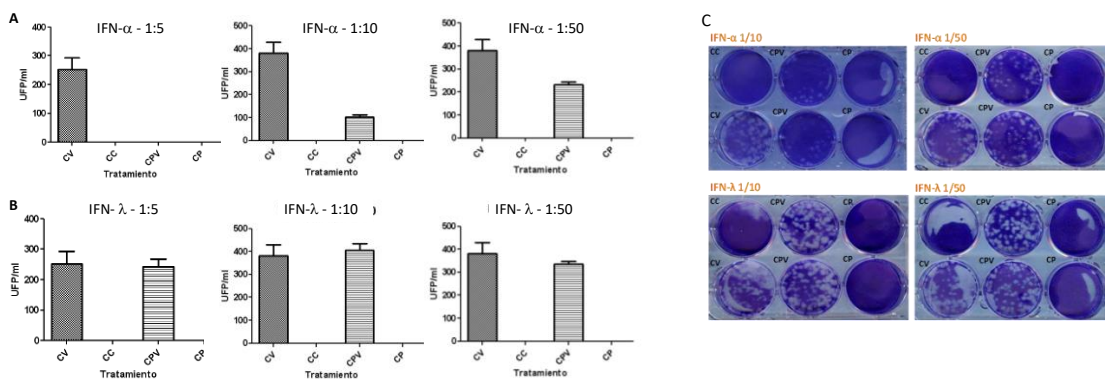
**TABLA 1.2: Evaluación de la citotoxicidad de los IFNr utilizando la tinción con cristal violeta.** Los valores de DO obtenidos por la lectura del cristal violeta solubilizado fueron utilizados para estimar el porcentaje de toxicidad para cada dilución de IFN- $\lambda$ 3 (A) e IFN- $\alpha$  (B). Citotoxicidad (%)= 100 x[(A-B)/B] siendo "A": Promedio DO células no tratadas, y "B": Promedio DO células tratadas. 73

**ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES: UNIDADES FORMADORAS DE PLACA**

Se evaluó la actividad de las proteínas expresadas en los sobrenadantes de las células transfectadas realizando ensayos de actividad en contra el virus de la fiebre aftosa (VFA) en células RFB. Se utiliza este modelo, ya que ha sido descrito que ambos IFN poseen actividad antiviral frente a este virus [12] [13].

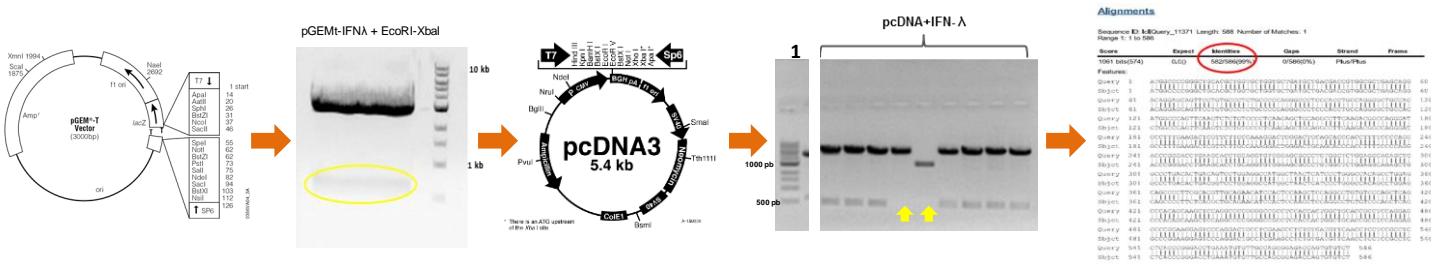
En una primera instancia se tituló, mediante la técnica de UFP (unidades formadoras de placa) el VFA a utilizar (cepa O1-Campos), se evaluaron los resultados de acuerdo a la presencia o no de placas de lisis y se consideraron los pocillos que contenían entre 100-150 placas. En base a los resultados observados se decidió trabajar con la dilución  $1 \times 10^{-4}$  del virus.

Para realizar el ensayo de actividad en el modelo de VFA se utilizó un cultivo primario de RFB. Se trabajó con cultivo primario de células bovinas porque los IFN $\gamma$  bovinos resultaron tóxicos para las células de hámster (BHK-21). Utilizamos el sobrenadante de las transfecciones realizadas con Polyfect (Qiagen®) en células HEK293T, tanto para el IFN- $\alpha$  como IFN- $\lambda$ 3. Las células fueron pre-tratadas con distintas diluciones de los sobrenadantes correspondientes (1/5, 1/10, 1/50) o con MEM-D 2% (Control) e incubadas durante 24 hs a 37°C y 5% CO $_2$ . Luego del pre-tratamiento las células fueron infectadas con VFA O1-Campos dilución  $1 \times 10^{-4}$  o incubadas con MEM-D incompleto a 37°C, 5% CO $_2$  durante 45 min. El IFN- $\alpha$ , dilución 1/5, fue capaz de inhibir completamente la infección de las células de RFB por el VFA ya que en los pocillos pre-tratados con este IFN e infectados con el virus no se evidenció presencia de placas de lisis (Figura 1.11 A). En el caso del IFN- $\lambda$ 3 se observó formación de placas de lisis en igual número con los controles no tratados y por lo tanto nos indica que este IFN no fue capaz de inhibir la infección con ninguna de las diluciones de trabajo (Figura 1.11 B). Las células de RFB no mostraron evidencias de cambios en la viabilidad, como era esperado (Figura 1.11 C).



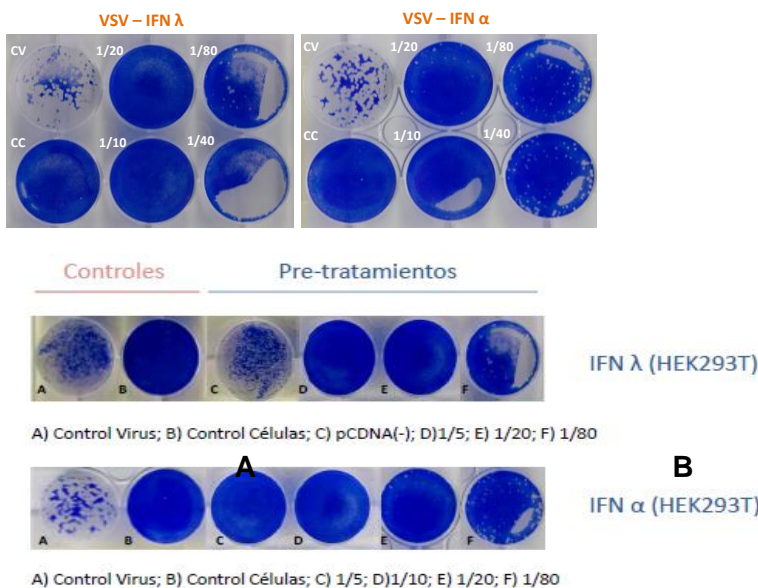
**Figura 1.11: actividad de los IFN clonados en pcDNAhismaxA expresados en células HEK293T.** Los sobrenadantes de transfección diluidos 1:5, 1:10 ó 1:50 conteniendo IFN- $\alpha$  (A) o bien IFN- $\lambda$ 3 (B) fueron utilizados para tratar células RFB antes de la infección con VFA y se determina el número de unidades formadoras de placa por ml para cada dilución de IFN. (B) Experimento representativo. CV: control de virus, CC: control de células, CPV: células tratadas con IFN antes de la infección con el VFA; CP: células tratadas con IFN, no infectadas.

Resultados de otros grupos han reportado que la presencia de los residuos de histidina altera la actividad de los interferones [135], por lo que decidimos clonar nuevamente el IFN- $\lambda$  sin el His-Tag. El inserto fue extraído de pGEM-T y clonado en pCDNA3 (Invitrogen®) (Figura 1.12).



**Figura 1.12. Estrategia utilizada para el sub-clonado del ORF del IFN- $\lambda$  en pcDNA3.** El pGEMt-IFN $\lambda$ 3 fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI-XbaI para liberar el inserto y sembrarlo en un gel de agarosa preparativo como muestra la figura. El fragmento es incorporado al vector pcDNA3. Los plásmidos obtenidos son analizados en un gel de agarosa para seleccionar los clones positivos que incorporaron el inserto. Calle 1: ladder (1Kb) y con flechas amarillas se indican las muestras negativas. El resto liberan un fragmento de ~588 pb. El inserto fue enviado a secuenciar y como muestra la figura se corrobora un 99% de homología con la secuencia de referencia.

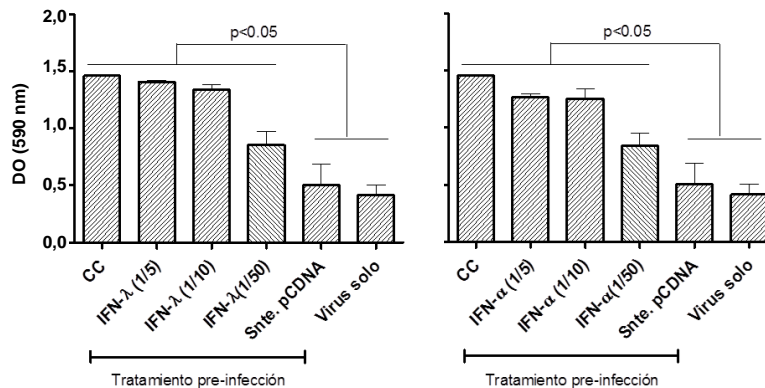
Los sobrenadantes de transfección (realizados en las mismas condiciones que se muestran más arriba) y la actividad del IFN- $\lambda$ 3 fue evaluada mediante tinción con cristal violeta en células MDBK infectadas con VSV, juntamente con IFN- $\alpha$ . Los resultados se muestran en la Figura 1.13. Al remover la secuencia codificante para Poly-His obtuvimos IFN- $\lambda$ 3 activo, con valores de actividad semejantes a los IFN- $\alpha$ , tal como fuera descrito anteriormente [115].



**Figura 1.13. Efecto de la remoción de las histidinas en la capacidad antiviral del IFN- $\lambda$ 3.** Células MDBK fueron pre-tratadas con diferentes concentraciones de IFN $\lambda$ : 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 o bien se trataron con sobrenadantes de células HEK293T transfectadas con plásmido vacío y otras no recibieron tratamiento a modo de control. Luego de 48 hs de incubación se revela con cristal violeta y se observan las UFP para determinar la actividad antiviral del IFN- $\lambda$ .

## CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES ACTIVAS DE INTERFERON

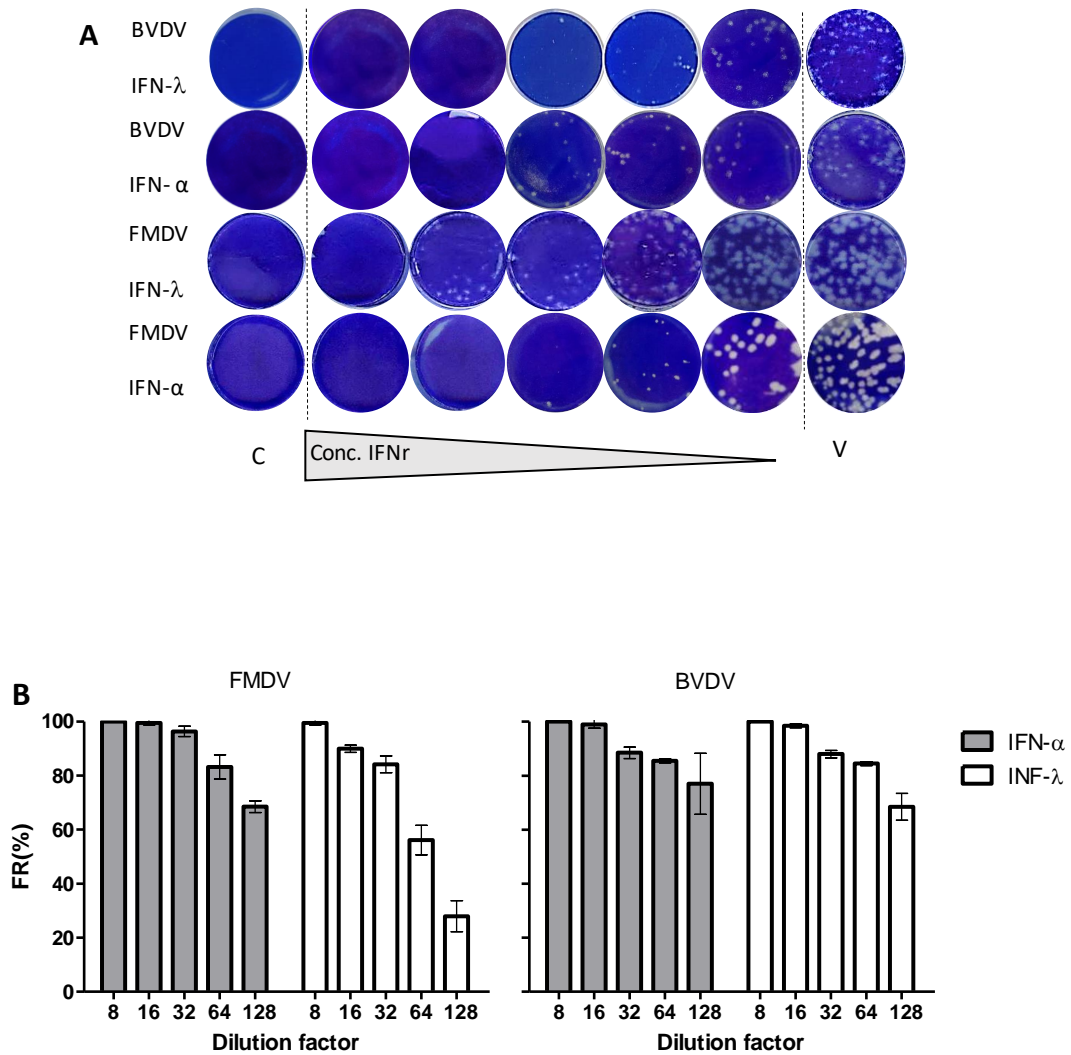
La concentración activa de los IFN recombinantes definidos como concentración efectiva 50%, “CE50” se obtuvo mediante el ensayo de reducción de unidades formadoras de placas en monocapas de células MDBK infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), que es la metodología estándar utilizada para la determinación de unidades infecciosas [136]. Una unidad de IFN es aquella capaz de reducir a la mitad el número de UFP respecto del control de células infectadas. Con los datos de CE50 y un cálculo matemático simple se determinaron las concentraciones de los stocks de IFNr, siendo de 43 U/ml para IFN- $\alpha$  y de 45 U/ml para IFN- $\lambda$  [136] (Lote 1, Figura 1.14).



**Figura 1.14. Cuantificación de unidades activas de IFNr:** La actividad de diferentes diluciones del sobredante de transfección de células HEK 293 transfectadas con plásmidos codificantes para IFN- $\lambda$  (A) o IFN- $\alpha$  (B) fue medida mediante tinción con cristal violeta. Se indican las diferencias significativas evaluadas por ANOVA 1 vía, seguido de Bonferroni (Intervalo de confianza: 95%).

## SENSIBILIDAD DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES CONTRA EL VFA Y EL VDVB-CEPA SINGER

Se utilizó el ensayo de reducción de UFP para evaluar la actividad antiviral *in vitro* de nuestras preparaciones de IFNr contra el VFA y la cepa citopática VDVB Singer. (Figura 1.15 A). Para determinar el efecto antiviral de los IFNr, se sembraron células MDBK y RFB en una placa de 6 pocillos, se trataron con cada preparación de IFNr durante 24 horas y luego se infectaron con 100 UFP de cada virus, por triplicado. La línea de base para el control negativo (células infectadas no tratadas) fue la media del número de focos virales + DE en los pocillos no tratados. Luego, el porcentaje de reducción de focos (FR%) en comparación con el control negativo se calculó de la siguiente manera:  $FR (\%) = (V - I) \times 100 / V$ . Donde, V es la media del número de focos para los pocillos de control negativo (virus solo, sin IFN) y I es la media del número de focos en los pocillos tratados con IFN. El número de virus de FFU fue proporcional a la disminución en la concentración de IFN (Figura 1.15 B).



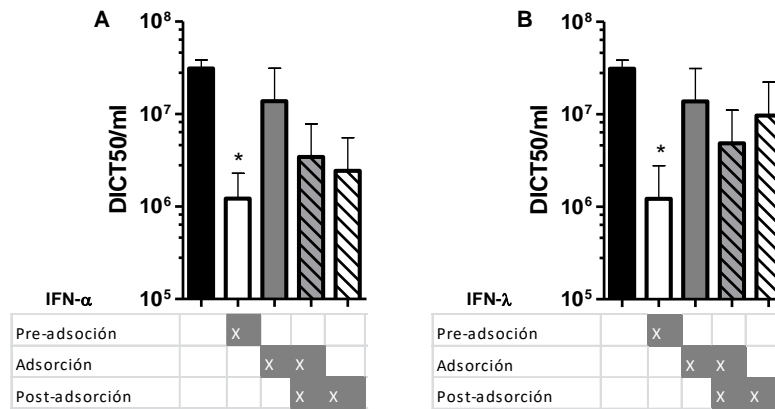
**Figura 1.15. Actividad de los IFN recombinantes contra el VFA y la cepa vacunal del VDVB Singer cp.** (A) Resultados obtenidos después de la infección con el VFA cepa A24/Cruzeiro o para la cepa VDVB-Singer en células RFB o MDBK, respectivamente, tratadas previamente con diferentes concentraciones de las preparaciones de IFN- $\alpha$  o IFN- $\lambda$  recombinantes (sobrenadantes de células HEK293T transfectadas con los plásmidos pCDNA que expresan dichos IFN). También se muestran los pocillos de control de las células "V" no tratadas e infectadas, o las células "C" no tratadas con IFN ni infectadas. (B) Para cada dilución de IFN- $\alpha$  e IFN- $\lambda$  se estimó el porcentaje de unidades formadoras de Focos (media  $\pm$  valores de DO de los triplicados).

### ENSAYO DE TIEMPO DE ADICIÓN

En la gran mayoría de los estudios reportados con IFNs *in vitro*, se realiza una preincubación de las células con estas citoquinas durante toda la noche. Nosotros decidimos

evaluar si esta metodología era la más adecuada para el trabajo con nuestros IFN $\alpha$  y si los mismos eran funcionales agregados durante la adsorción, después de la adsorción o desde la adsorción y durante todo el tiempo en que transcurre la infección. Para realizar este estudio utilizamos el VDVB cepa Singer, cepa vacunal citopática y medimos infección viral titulando los sobrenadantes mediante Reed y Muench (ver materiales y métodos). Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Los resultados muestran que únicamente se logra disminuir significativamente la infección viral cuando las células son pre-tratadas con los IFN $\alpha$  antes de la adsorción. También observamos una disminución del título viral cuando el IFN $\alpha$  se mantuvo en el medio de infección después de la adsorción, probablemente por su capacidad de inducir un estado antiviral a las células no infectadas en el primer ciclo infectivo. La falta de actividad en el caso del IFN $\alpha$  adicionado con el virus en la adsorción demuestra la ausencia de actividad virucida (Figura 1.16).



**Figura 1.16. Efecto del momento del agregado de los IFN durante el ciclo de infección viral.** Monocapas de células MDBK fueron tratadas con IFN- $\alpha$ (A) o IFN- $\lambda$ 3 (B) en distintos momentos del ciclo infectivo, según se indica. La infección se realizó con VDVB cepa Singer (1a, CP) a una moi= 0,5. \*Diferencias significativas respecto al control de infección,  $p < 0.05$ .

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES EN CÉLULAS MDBK-T2

Los promotores de los genes Mx se han estudiado en detalle en humanos [137], ratones [138] y varias especies de teleosteos [139]. Los promotores Mx contienen al menos un motivo ISRE. La presencia de los motivos ISRE en los promotores Mx indica su conexión a la vía típica de los IFN, activando la transcripción de los genes inducibles por IFN (ISG). Nosotros contamos con una línea celular (MDBK-t2) que contiene de forma estable el promotor Mx humano río arriba del ORF para la cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Este promotor es sensible a los IFN bovinos [121], [122]. De esta forma, la cantidad de CAT cuantificada por ELISA correlaciona con la cantidad de unidades de IFN con el que se estimularon las células [122]. Utilizando un IFN de referencia de actividad conocida

(expresada en Unidades/ml) se puede calcular la concentración IFN activo en los sobrenadantes de transfección.

Los resultados obtenidos con esta técnica se muestran en la Tabla 1.3. Se corroboró por este método, la falta de actividad del IFN- $\lambda$ 3 con Poly-His. Los diferentes lotes preparados cuentan con una actividad similar. Este método no solamente permite una cuantificación simple de los IFNr sino que además corrobora su capacidad de activar ISG.

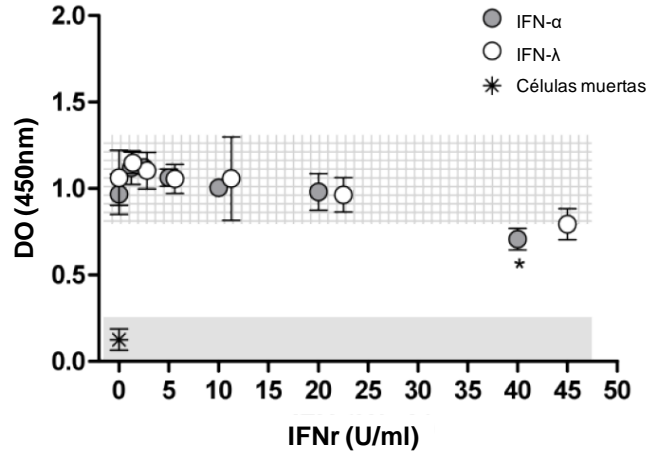
Transfecciones HEK 293	
Vector	Conc. U/ml
pcDNA (vacío) Lote1	7,0
pcDNA-IFNI Lote 1	32,0
pcDNA-IFNI HIS Lote 2	3,5
pcDNA-IFN $\alpha$ HIS Lote 1	29,2
pcDNA (vacío) Lote2	3,7
pcDNA-IFNI Lote 2	33,7
pcDNA-IFN $\alpha$ HIS Lote 2	33,5
pcDNA (vacío) Lote3	2,8
pcDNA-IFNI Lote 3	35,2
pcDNA-IFN $\alpha$ HIS Lote 3	35,1

**TABLA 1.3. Concentración de IFN activo determinado por CAT-ELISA.** Células MDBK-T2 que contienen integrado al genoma el gen para CAT bajo el promotor Mx fueron tratadas con los sobrenadantes de células HEK293T transfectadas con los vectores que se indican. Las células son lisadas, se determinan proteínas totales y se mide la cantidad de IFN activo en función a la concentración de CAT estimada por ELISA.

## EFFECTO DE LOS INTERFERONES RECOMBINANTES SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Una vez establecidos los valores de unidades activas de cada lote de los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$ 3, las preparaciones de cada IFNr fueron agregadas a la monocapa de células MDBK en diluciones seriadas e incubadas durante 24 hs y la viabilidad celular fue evaluada mediante la determinación de la capacidad de las células de reducir XTT que resulta en una reacción colorimétrica, siendo una técnica más sensible que la tinción con cristal violeta.

Se estimó un rango de valores de DO para células no-infectadas y células no tratadas (DO: 0,9-1,2) y para células infectadas con la cepa Singer de VDVB (MOI=1, 48 hs pi) o metabólicamente estresadas y blancos (DO<0,22). Las concentraciones de IFN- $\lambda$ 3 de hasta 45 U/ml no resultaron tóxicas para las MDBK. El rango fue más bajo para el IFN- $\alpha$ , la concentración más alta evaluada arrojó valores de DO que fueron significativamente más bajos que aquellos medidos para las células sin-tratamiento o las células con tratamiento simulado (p<0,05) Figura 1.17.



**Figura 1.17. Efecto de los IFN $\alpha$  sobre la viabilidad celular.** Las células fueron tratadas con diluciones seriadas de IFN $\alpha$  y la viabilidad celular fue evaluada mediante la determinación de la capacidad de las células de reducir el XTT. Valores de DO para células no infectadas: 0,9-1,2 y para células infectadas con VDVB-Singer o metabólicamente estresadas: <0,22 (marcadas en gris). Los resultados están expresados como la media de los valores de DO  $\pm$  DE. (\*) Diferencias significativas comparadas con los valores de DO de las células sin tratar,  $p < 0,05$ .

Con estos resultados se procedió a estimar el porcentaje de citotoxicidad, siguiendo la metodología descrita más arriba. La citotoxicidad de los stocks utilizados, aún sin diluir, no alcanza el 50% para ninguno de los IFN $\alpha$ , siendo una dilución al medio totalmente inofensiva y atóxica para las células (Tabla 1.4). Basándonos en este ensayo, se seleccionó una concentración de trabajo para ambos IFN $\alpha$  que no afectara en absoluto la viabilidad de las células MDBK (~20 U/ml).

IFN- $\alpha$ (UI/ml)	40	20	10	5	2,5	1,25	0
	0,66	0,86	1,01	1,02	1,14	1,01	0,92
	0,78	1,07	0,99	1,06	1,08	1,18	0,88
	0,68	1,01	1,01	1,12	1,15	1,18	1,10
PROMEDIO	0,71	0,98	1,00	1,06	1,12	1,12	0,97
Citotoxicidad (%)	36,66	-1,36	-3,78	-9,18	-13,82	-13,82	

IFN- $\lambda$ (UI/ml)	45	22,5	11,25	5,62	2,81	1,41	0
	0,762	0,905	0,914	1,03	1,12	1,09	0,889
	0,724	1,079	1,351	1,15	1,2	1,15	1,1
	0,896	0,908	0,922	0,989	0,99	1,21	1,2
PROMEDIO	0,79	0,96	1,06	1,06	1,10	1,15	1,06
Citotoxicidad (%)	33,88	0,28	-9,01	-8,49	-12,39	-15,94	

**TABLA 1.4. Evaluación de la citotoxicidad de los IFN $\alpha$  utilizando la determinación de viabilidad mediante reducción del XTT.** Los valores de DO obtenidos por la lectura del cristal violeta solubilizado fueron utilizados para estimar el porcentaje de toxicidad para cada concentración IFN- $\lambda$ 3 ó  $\alpha$ , según se indica.



## RESUMEN

Con el objetivo de desarrollar interferones de tipo I ( $\alpha$ ) y III ( $\lambda$ ) bovinos, se clonaron las secuencias para ambas citoquinas, obtenidas por RT-PCR a partir de ARNm total de células de riñón fetal bovino (cultivo primario) infectadas con el virus de la fiebre aftosa, capaz de inducir la expresión de ambos IFN en este tipo celular. El IFN- $\alpha$  fue elegido ya que es el IFN tipo I mayormente utilizado en terapias contra el VHC. Sin embargo, este IFN suele causar efectos adversos debido a que sus receptores son pleiotrópicos. Con el fin de contar con un segundo producto bioterapéutico nos enfocamos en el IFN- $\lambda$ 3 que tiene la misma actividad biológica que los IFN-I pero que posee receptores en células epiteliales, con especial tropismo por los epitelios de las superficies mucosales.

Se realizaron construcciones independientes conteniendo el ORF para los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  en un plásmido que permite la expresión desde el promotor de CMV, en células de mamífero. Este plásmido incorporaba además, en el extremo carboxilo terminal de la proteína expresada, una secuencia de 6 Histidinas (Poli-HIS) que permiten la detección de la proteína expresada y eventualmente su purificación utilizando columnas de afinidad. Se transfectaron células HEK293T y se obtuvieron los productos de expresión del tamaño esperado que fueron revelados con un anticuerpo comercial anti-HIS. Los IFNr expresados en este sistema se acumulaban en el sobrenadante de las células transfectadas a las 48 hpt.

Se determinó entonces la actividad de los IFNr por dos metodologías: (1) reducción del número de placas de lisis utilizando VSV como virus de referencia y VFA, para el cual la actividad de los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  bovinos ha sido descrita en profundidad; y (2) capacidad de los IFNr de activar al promotor Mx utilizando un sistema reportero (células MDBK-T2/CAT). El IFN- $\alpha$  fue activo, no así el IFN- $\lambda$ . Trabajos anteriores con IFNr de otras especies habían mostrado que, en algunos casos, la presencia de secuencias adicionales como la etiqueta de histidinas "HIS-Tag" podría interferir con la actividad de este IFN. El ORF para IFN- $\lambda$ 3 fue entonces sub-clonado en un plásmido equivalente, pero sin dicha secuencia.

La actividad de los IFNr fue determinada por los métodos antedichos, obteniéndose lotes de IFN- $\alpha$  e IFN- $\lambda$ 3 bovinos biológicamente activos con una concentración efectiva 50% de aproximadamente 40 U/ml. Los valores fueron similares a los estimados por reducción del número de placas de VSV. Habiendo comprobado la capacidad de estos sistemas para producir las proteínas recombinantes con la actividad esperada, se procedió a evaluarlos en cuanto a su eficacia contra diferentes cepas del VDVB.

---

## RESULTADOS - CAPITULO 2

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS INTERFERONES $\alpha$ Y $\lambda 3$ RECOMBINANTES CONTRA EL VDVB *IN VITRO*

#### OBJETIVOS

- Evaluar la actividad de los IFN $\alpha$  de inhibir la replicación de diferentes cepas de referencia y aislamientos locales del VDVB en células MDBK.
- Desarrollo de un método simple y confiable para la evaluación de la actividad antiviral de los IFN $\alpha$  producidos en nuestro laboratorio sobre diferentes cepas del VDVB.

#### INTRODUCCIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La evaluación de la actividad antiviral de los IFN $\alpha$  y otros compuestos requiere ensayos basados en cultivos celulares para la estimación de la reducción de la infectividad viral [140]. Dicha reducción es estimada de manera indirecta mediante la determinación del título viral expresado generalmente como UFP/ml [141] o través del cálculo de DITC50 [131], entre otras metodologías. Estas son, en general, técnicas laboriosas además de requerir la cosecha de los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Los ensayos de reducción del efecto citopático (ECP) basado en técnicas colorimétricas que evalúan la viabilidad celular son una opción de alto rendimiento, pero son aplicables únicamente a cepas CP. Hasta el momento no existía un ensayo de alto rendimiento para evaluar la actividad antiviral de compuestos que sea aplicable tanto a cepas CP como NCP, excepto la qPCR, pero como desventaja implican costos extremadamente altos. A partir de estas limitaciones surgió la necesidad de establecer un método eficiente, de alto rendimiento, bajo costo y fácil aplicación tanto para cepas CP como NCP. De esta manera, desarrollamos el ELISA en células que permite la determinación de la infectividad viral mediante la detección de la proteína NS3 altamente conservada en la familia de los pestivirus y esencial en la replicación viral ya que tiene actividad Helicasa/NTPasa, esencial para la síntesis de la cadena negativa de ARN y por lo tanto en la producción de partículas virales [142]. Esta proteína es detectada directamente sobre las células fijadas en el pocillo de la placa de cultivo sin necesidad de cosecharlas. De esta manera se generó un protocolo sencillo y aplicable a cepas CP y NCP del VDVB.

## RESULTADOS

### ELISA EN CÉLULAS

#### PUESTA A PUNTO DEL ELISA EN CÉLULAS

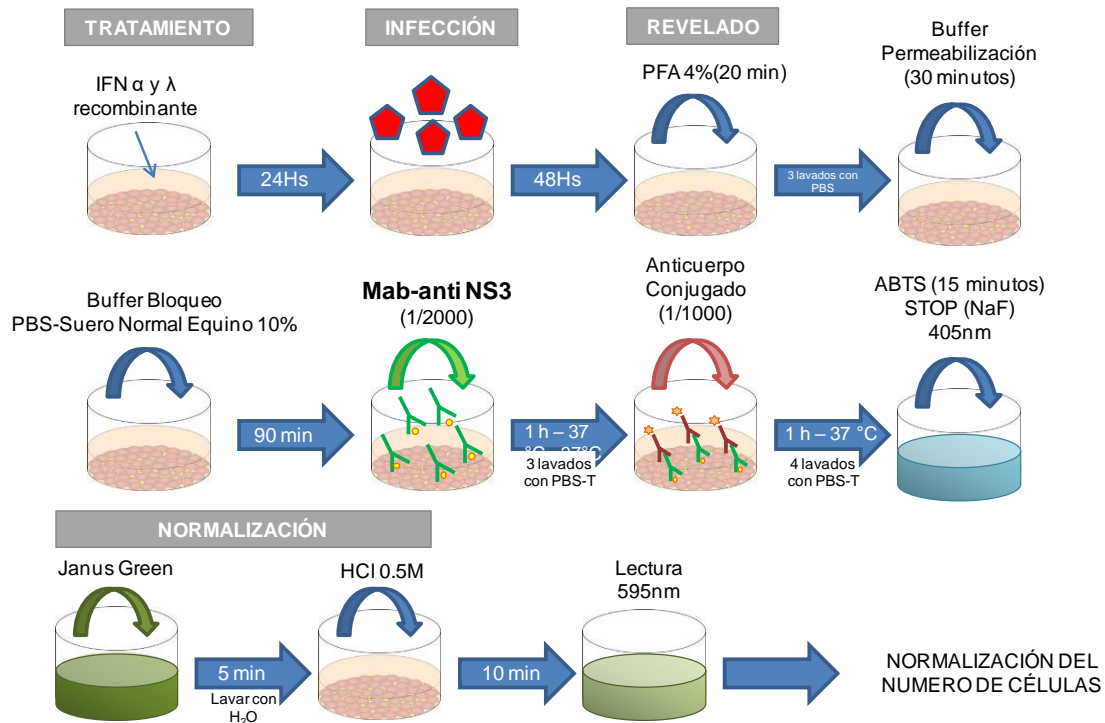
Este ELISA se realizó sobre la placa de cultivo, para lo cual las células fueron fijadas y luego se procedió como un ELISA indirecto tradicional. Para la puesta a punto del ELISA en células se ensayaron diferentes bloqueantes, distintas diluciones del anticuerpo detector primario y del conjugado; también se probaron distintos sustratos para la peroxidasa, tal como se resume en la Tabla 2.1. La combinación de reactivos que permitió obtener mejores resultados fue la que utilizó suero normal equino (SNE) al 10% como solución de bloqueo, dilución 1/2000 del anticuerpo primario anti NS3 (Mab Anti NS3 – Prionics® provisto amablemente por el Dr. Gerrit Kaizer), dilución 1/1000 del anticuerpo secundario (anti-ratón conjugado a peroxidasa; Antimouse Peroxidase Labeled KPL®) y ABTS como revelador (Figura 2.1). Para cada cepa viral se estableció la MOI de trabajo y el tiempo de infección teniendo en cuenta que la lectura de densidad óptica (DO) obtenida en las células infectadas pero no tratadas con los IFNr debía arrojar valores cercanos a 1 (DO= 1.00 ± 0.4), (Tabla 2.2).

Condición	Solución de Bloqueo	Anticuerpo Primario (factor dilución)	Conjugado (factor dilución)	Sustrato	$\Delta OD \pm SD$
1	0.5 % Caseína	500	750	TMB	0.327 ± 0.001
2			1,000		0.298 ± 0.002
3			750		0.362 ± 0.023
4		1,000	1,000		0.420 ± 0.004
5		750	0.450 ± 0.006		
6		2,000	1,000		0.408 ± 0.042
7	10 % Suero Normal Equino	500	750	ABTS	0.995± 0.056
8			1,000		0.938± 0.013
9			750		1.041± 0.099
10		1,000	1.005± 0.078		
11		750	1.382± 0.016		
12		2,000	1,000		1.187± 0.049

**Tabla 2.1.** Parámetros experimentales evaluados para la puesta a punto del ELISA en células.

Cepa VDVB	Genotipo	Biotipo	GenBank accession number	Virus stock (DICT50/ml)	MOI	Valor DO ± DS
						ELISA en células, triplicados
Singer	1a	CP	DQ088995.2	2.08x10 <sup>7</sup>	0.05	0.99 ± 0.02
98-204	1b	NCP	N/A	1.64x10 <sup>6</sup>	0.001	1.11 ± 0.05
NY1	1b	NCP	L32879.1/ AF145363.1	6.55x10 <sup>6</sup>	0.001	1.09 ± 0.12
NY93	2a	NCP	AF039173/ KR093034.1	6.55x10 <sup>6</sup>	0.001	1.07 ± 0.05
VS253	2a	CP	N/A	2.62x10 <sup>7</sup>	0.05	1.09 ± 0.13
98-124	2b	NCP	MH074881	1.31x10 <sup>7</sup>	0.001	1.22 ± 0.02

**Tabla 2.2.** Stocks virales y optimización de la dosis infectiva.



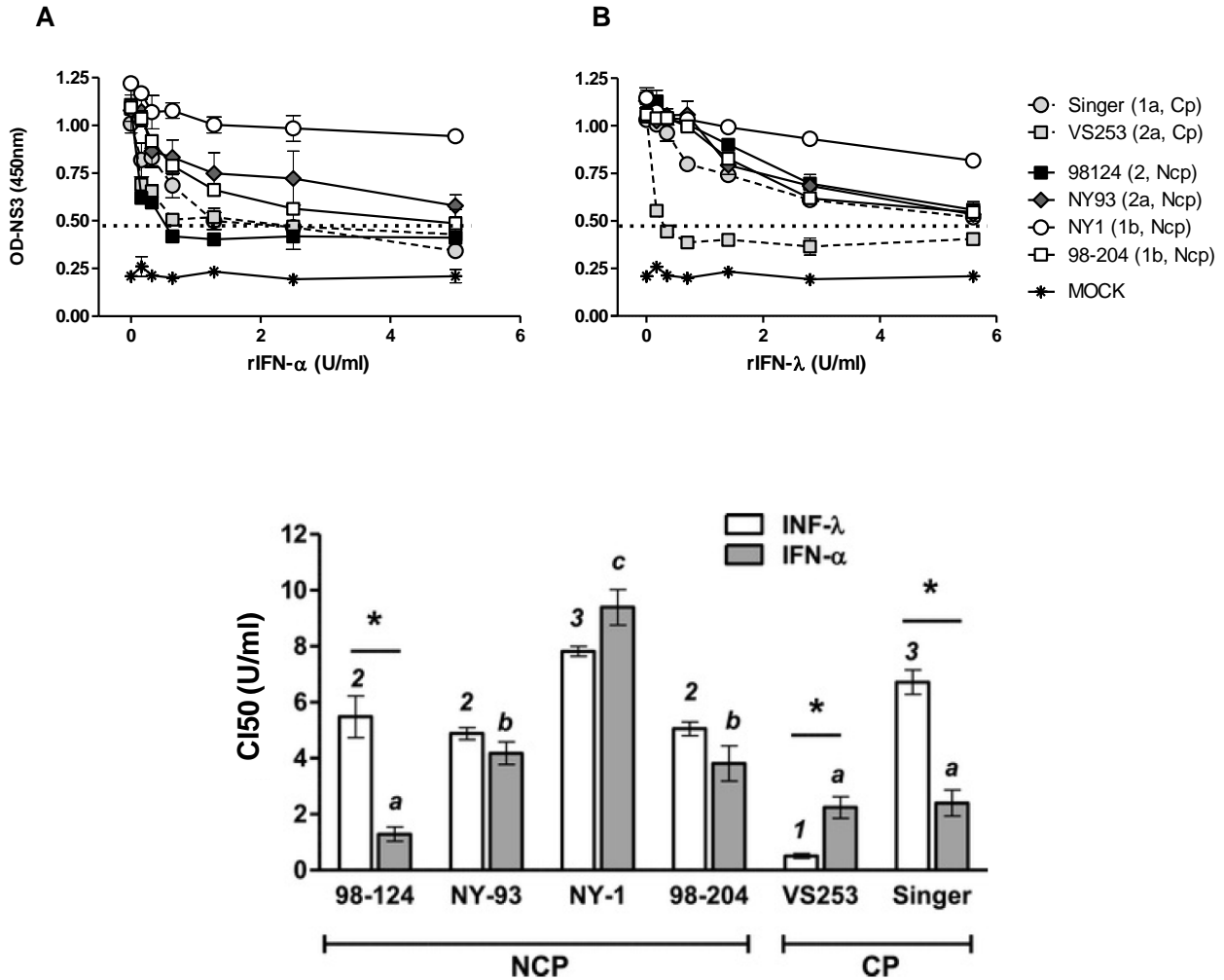
**Figura 2.1.** Esquema del protocolo paso a paso del ELISA en células.

Las células fueron infectadas con el VDVB y tratadas con las diferentes diluciones de los IFNr. A partir de este procedimiento se obtuvo una curva que en el rango de 0 a 3 U/ml se ajustó a una regresión lineal. A partir de la ecuación de la recta de  $DO=f(U/ml \text{ de IFN})$  y utilizando el valor de DO que inhibe el 50% de la infección ( $DO/2$  de los pocillos con células infectadas pero no tratadas con IFN) se obtuvo la  $CI_{50}$  de los IFNr  $\alpha$  y  $\lambda 3$  para cada cepa en particular (Tabla 2.3).

Cepa	Genotipo	Biotipo	ELISA en células $CI_{50}$ (U/ml)	
			IFN- $\alpha$	IFN- $\lambda$
Singer	1a	citopático	3,26	4,97
VS253	2a	citopático	2,66	0,41
98-204	1b	No citopático	2,46	5,31
NY1	1b	No citopático	4,31	4,16
NY93	2a	No citopático	4,40	3,97
98-124	2b	No citopático	0,89	4,94

**Tabla 2.3.**  $IC_{50}$  de IFN- $\alpha$  y  $\lambda 3$  para cada cepa de VDVB determinada con el ELISA en células.

En las figuras 2.4 y 2.5 se presentan los gráficos de las diferentes cepas tratadas con ambos IFNr obtenidos a partir de tres réplicas experimentales. Todas las cepas son sensibles a ambos IFNr. Sin embargo, no se puede establecer un patrón que relacione la sensibilidad a los IFNr con el genotipo y/o biotipo viral, pero, efectivamente, se observan diferentes grados de sensibilidad entre las cepas. Comparadas entre sí, la cepa del VDVB más sensible al IFN- $\lambda 3$  sería VS253 (Figura 2.2 B y 2.3), mientras que la cepa 98-124 (Figura 2.2 A y 2.3) sería mayormente afectada por el IFN- $\alpha$ . Esta última cepa (genotipo 2) fue caracterizada como de baja virulencia en contraposición a la cepa NY-93 del mismo genotipo pero de alta virulencia [29], [133]. Como se mencionó anteriormente, el ELISA en células relaciona unidades de DO con la presencia de la proteína NS3 en la monocapa celular. Por lo tanto, si un virus es más sensible a la presencia de un antiviral que a otro se observará una DO disminuida y consecuentemente un menor valor de  $CI_{50}$  para ese antiviral. Teniendo en cuenta esto, es importante mencionar que si bien la sensibilidad de la cepa NY-93 de alta virulencia no parece ser tan marcada cuando es estudiada mediante ésta técnica, cuando fue evaluada en ensayos preliminares mediante titulación de partículas virales en el sobrenadante de los cultivos celulares ( $DITC_{50}/ml$ ) parecería mostrar una mayor sensibilidad al IFN- $\lambda 3$  ( $CI_{50}=1,16$  U/ml), manteniendo su menor sensibilidad al IFN- $\alpha$  ( $CI_{50}=3,82$  U/ml). Al evaluar cadena negativa del genoma viral por qRT-PCR no se observaron variaciones entre las células tratadas con IFNr y las no tratadas. Por lo tanto, teniendo en cuenta estas observaciones, podríamos inferir que las distintas cepas serían sensibles a los IFNr en diferentes etapas de la producción de la partícula viral.



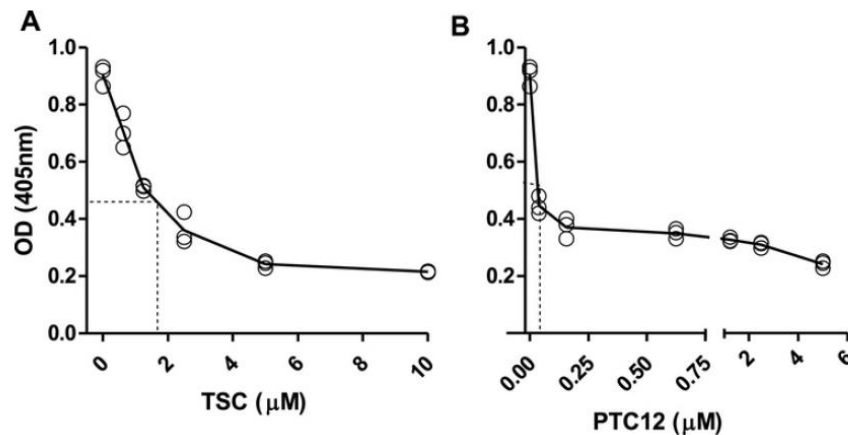
**Figura 2.3. Sensibilidad de las diferentes cepas de de VDV-B a los IFNr.** Los valores de de CI50 fueron trazados para las cepas NCP (98-124, NY-93, NY-1 y 98-204) y para las cepas CP (VS253 y Singer) de VDV-B. Se muestran los valores promedio  $\pm$  DE de las determinaciones por triplicado. Diferentes letras y números arriba de las barras representan diferencias significativas para IFN- $\alpha$  o IFN- $\lambda$ 3, respectivamente ( $p < 0,05$ ). (\*) Diferencias significativas en los valores de CI50 determinados para cada IFN para la misma cepa viral ( $p < 0,05$ ).

### APLICACIÓN DEL ELISA EN CÉLULAS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE OTROS ANTIVIRALES

Para extender nuestro análisis, evaluamos la capacidad del ELISA en células para estimar la Concentración Inhibitoria 50% (CI50) de otros dos compuestos con diferente actividad antiviral: TSC, un inhibidor de la polimerasa del VDV-B [117] y PTC12 que interfiere

específicamente en la entrada del virus a la célula [116]. Diluciones seriadas de TSC desde 10  $\mu\text{M}$  fueron agregadas a las células luego de la adsorción con VDVB-NADL (MOI=0,05). Por otro lado, PTC12 fue agregado junto con el VDVB-VS253 y la incubación fue de 72 hs. Cada tratamiento fue realizado por triplicado (Figura 2.4).

Los valores de CI50 fueron estimados para ambos compuestos y comparados con los reportados anteriormente evaluando la reducción del efecto citopático usando cristal violeta [116], [117]. La CI50 para las células MDBK tratadas con PTC12 e infectadas con VS253 fue de  $0,0257 \mu\text{M} \pm 0,004$  medido con el ELISA en células, similar al valor reportado ( $0,026 \pm 0,002$ ). La CI50 para TSC fue de  $1,75 \mu\text{M}$  utilizando el método colorimétrico [117], [143] y de  $1,91 \mu\text{M} \pm 0,21$  con el ELISA en células. Estos resultados demuestran que el ELISA en células puede ser utilizado no solo con los IFNr sino también para otros compuestos antivirales.

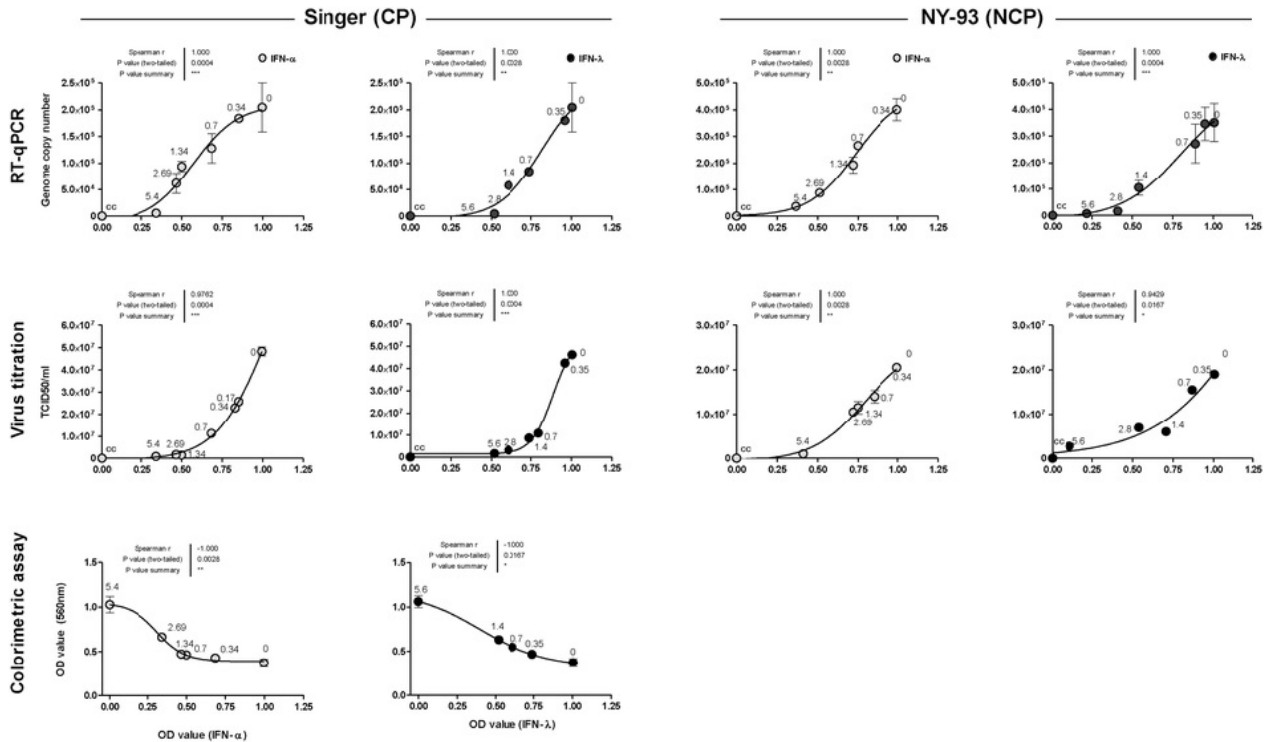


**Figura 2.4. Actividad antiviral de TSC y PTC12.** Se trataron células MDBK con diluciones seriadas al medio de TSC (A) o PTC12(B) y fueron infectadas con cepas CP de VDVB. El gráfico representa valores de DO por triplicado y la correspondiente curva. Los valores de CI50 fueron estimados con el ELISA en células que detecta NS3. Mediante la interpolación de los valores de DO correspondientes al 50% de las lecturas de las células no tratadas/células infectadas (indicado con la línea de puntos).

## CORRELACIÓN ENTRE EL ELISA EN CÉLULAS Y LOS MÉTODOS UTILIZADOS ACTUALMENTE

Las células MDBK fueron pre-incubadas con diferentes concentraciones de cada preparación de IFNr antes de la infección con VDVB cepa Singer (CP) o NY-93 (NCP). La actividad antiviral de cada IFNr fue estimada utilizando el ELISA en células, titulación viral de los sobrenadantes, cuantificación de ARN viral con qRT-PCR y ensayos colorimétricos

de viabilidad (solo para la cepa CP). Las curvas de correlación fueron construidas con los valores estimados para cada dilución de IFN $\alpha$  mediante el ELISA en células y los métodos actuales (Figura 2.5). El análisis de Spearman demostró una correlación significativa entre los resultados obtenidos con el ELISA en células y aquellos estimados con las otras pruebas ( $p < 0.05$ ) para ambas cepas CP y NCP. Hubo una correlación positiva entre los resultados del ELISA en células y el ratio de número de copias de genoma o de la DITC50/ml para ambos IFN $\alpha$  y cepas virales ( $r = 1$ ) y, como era esperado, hubo una correlación negativa con el método de viabilidad celular para la cepa citopática.



**Figura 2.5. Correlación entre los diferentes métodos de evaluación de actividad antiviral.** La actividad antiviral de IFN $\alpha$  (círculos grises) e IFN $\lambda$ 3 (círculos negros) contra el VDVB (cepa Singer y NY-93) fue determinada con el ELISA en células que detecta NS3. Los resultados fueron comparados con los valores medidos por triplicado por tres técnicas utilizadas actualmente: cuantificación de ARN viral con qRT-PCR, titulación viral y evaluación colorimétrica de la viabilidad celular, como se muestra en la figura. El coeficiente de la correlación de Spearman y los P valor están representados para cada curva.

## RESUMEN

- El ELISA en células de alto rendimiento fue puesto a punto para la determinación de infectividad viral.



- Una proteína viral no estructural es detectada directamente sobre la monocapa celular.
- Cada resultado puede ser normalizado al total de células en el cultivo.
- El ELISA en células NS3 fue aplicado a las cepas CP y NCP del VDVB.
- Se evaluó la actividad antiviral contra cepas CP y NCP del VDVB.

*El desarrollo del ELISA en células surgió de la necesidad de evaluar la actividad antiviral de los IFN $\alpha$  producidos en nuestro laboratorio. Los ensayos disponibles presentaban múltiples limitaciones. Requeríamos un método de alto rendimiento, bajo costo y aplicable a cualquier cepa viral. Los ensayos colorimétricos de viabilidad celular son aplicables a cepas CP y la mayoría de los aislados de campo circulantes del VDVB son NCP. El ELISA en células mide la infectividad viral mediante la detección de una proteína no estructural del virus que se encuentra altamente conservada y que es producida durante la replicación viral. El ELISA es llevado a cabo sin necesidad de cosechar las células y fue desarrollado para evaluar la actividad antiviral de los IFN $\alpha$ . Los resultados correlacionaron con aquellos obtenidos mediante la qRT-PCR y la titulación viral. El ensayo fue también eficiente en la estimación de la CI50 de otros dos compuestos antivirales como la TSC y el PTC12. La estimación de la CI50 de cada IFN utilizando 6 cepas diferentes del VDVB con diferentes biotipos y genotipos mostró que las cepas CP son más susceptibles a ambos IFN $\alpha$ , mientras que las cepas NCP tipo 2 resultaron ser más sensibles al IFN $\alpha$ . Este formato en el cual se utiliza un anticuerpo detector contra una proteína no estructural conservada de un tipo viral puede ser potencialmente aplicable para medir de forma precisa la infectividad de cualquier cepa viral.*

---

## RESULTADOS – CAPÍTULO 3

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS INTERFERONES $\alpha$ Y $\lambda$ CONTRA EL VDVB *IN VIVO*: MODELO MURINO

#### OBJETIVOS

- Desarrollar un modelo murino de infección para VDVB.
- Realizar una evaluación preliminar de la actividad de los IFN $\alpha$  como antiviral para el tratamiento de las infecciones con el VDVB *in vivo*.
- Evaluar dosis y protocolos de administración de los IFN $\alpha$  en el modelo murino de infección para luego aplicarlo en el modelo bovino.

#### INTRODUCCIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La evaluación de la actividad antiviral de los IFN $\alpha$  *in vitro* arrojó resultados favorables para continuar con el estudio en modelos animales *in vivo*. Previo a realizar estudios en bovinos decidimos realizar una primera prueba de concepto en el modelo murino para evaluar la actividad de los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$ . Trabajos publicados por Seong y col [144], [145] reportan la utilización de ratones BALB/c como modelo de infección para VDVB. De esta manera evaluamos si los animales se infectaban con cepas de nuestro interés y caracterizamos el perfil de dichas infecciones. Las cepas del VDVB utilizadas fueron la NY-93 y la 98-124, ambas del genotipo 2 de alta y baja virulencia, respectivamente. Establecido el modelo de infección, el primer estudio consistió en la aplicación de los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  (comerciales, origen ratón) como pre-tratamiento o tratamiento, es decir, su administración previa o posterior a la infección viral. El último ensayo de esta etapa se realizó con el fin de delinear un protocolo más preciso de tratamiento con los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  para luego poder ser ensayado en el modelo bovino.

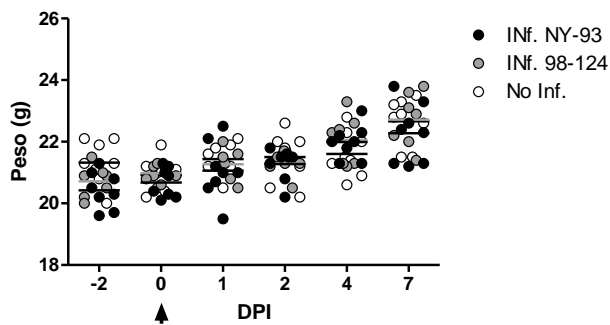
#### RESULTADOS

##### DESARROLLO DEL MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR EL VDVB

Basados en trabajos previos de otros grupos, desarrollamos un modelo murino de infección por el VDVB, con el objetivo de estudiar el efecto de antivirales *in vivo*. En un primer experimento, dos grupos de 8 ratones BALB/c (hembras, 6-8 semanas) fueron inoculados por vía intraperitoneal (ip) con 0,4 ml de una dosis de  $5 \times 10^5$  DICT50/ml de dos cepas del VDVB. Esta dosis fue la establecida por Seong y colaboradores en su trabajo de puesta a punto de este modelo [144]–[146]. Cuatro animales se dejaron como control sin infectar, y solamente recibieron 0,4 ml de medio de dilución. Se utilizaron dos cepas NCP del VDVB de genotipo 2, la cepa de referencia NY-93 y una cepa aislada de sangre de un ternero en la provincia de Buenos Aires, durante un brote en 1998 (cepa 98-124). La cepa NY-93 es de alta virulencia, mientras que 98-124 se considera una cepa “típica” de genotipo 2, de

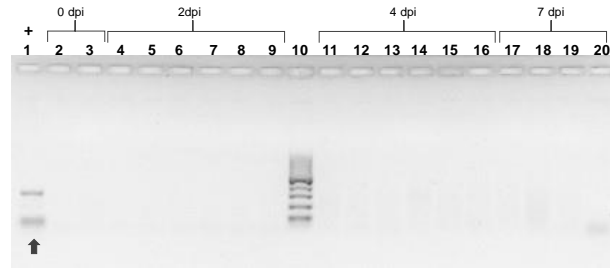
baja virulencia. Ambas cepas han sido extensamente caracterizadas por nuestro grupo de trabajo, tanto *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, utilizando terneros privados de calostro [21].

Los ratones fueron infectados utilizando la vía IP, y siguiendo el procedimiento descrito por Seong y col. [145], se obtuvieron muestras de suero de los ratones al iniciar el experimento y a los 2, 4 y 7 días post infección (dpi). A los 4 dpi se realizó la eutanasia de la mitad de los ratones (2 animales del grupo control y 4 animales infectados) y a los 7 dpi se realizó la eutanasia del total de los animales de los cuales en ambos tiempos se tomaron muestras de bazo, hígado, linfonódulos mesentéricos, pulmón, corazón, cerebro y riñón. Se tomaron dos muestras de cada órgano, una fue congelada para evaluar presencia de genoma viral y la otra fue conservada en formol buffereado, se incluyó en parafina y se realizaron cortes histológicos a fin de visualizar posibles lesiones histopatológicas. Se controló además peso y temperatura de los animales durante el periodo del experimento. Ninguno de los ratones mostró signos clínicos de enfermedad, ni comportamiento asociado con malestar. No se observaron cambios en el pelaje ni en la conducta o patrón de alimentación de los ratones. Los parámetros de peso (Figura 3.1) y temperatura (no se muestra) no se modificaron respecto de los valores del grupo no infectado durante todo el experimento.

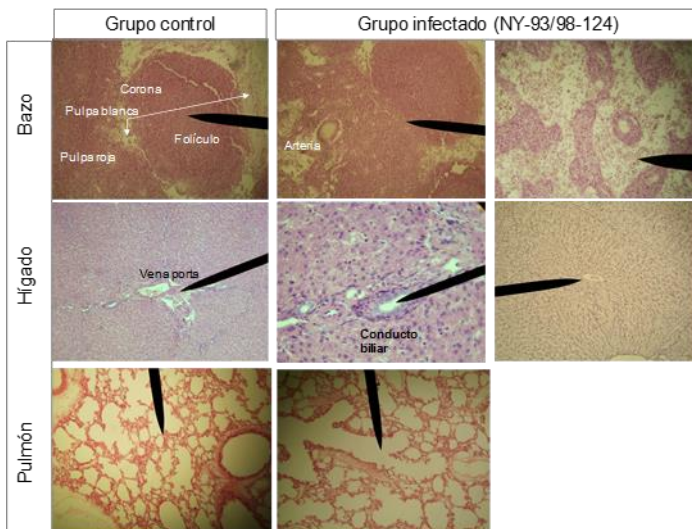


**Figura 3.1. Seguimiento del peso de los ratones infectados.** Se realizó un control diario del peso de los ratones infectados con el VDVB 98-214 o NY-93, respecto de ratones normales y con infección simulada. La flecha indica el día de la infección.

La distribución del virus en diferentes órganos y sangre entera de los ratones infectados se estudió mediante RT nested PCR (Figura 3.2). No se detectó genoma del VDVB en ninguna de las muestras de tejido de los ratones infectados, tampoco en aquellos infectados de forma simulada, como era de esperar. Los resultados del análisis histopatológico, realizado en el Instituto de Patobiología de INTA, no mostraron daños compatibles con la infección (Figura 3.3).



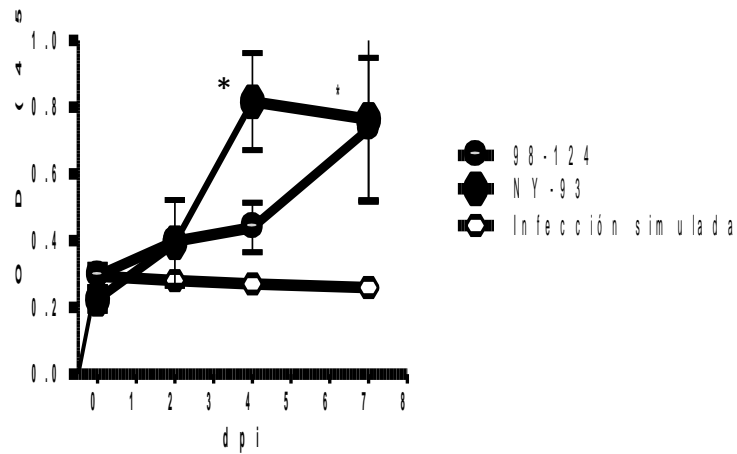
**Figura 3.2. RT-Nested PCR.** Gel de agarosa 1,5 % m/v. Productos de RT-Nested PCR para la detección de VDVb en muestras de sangre entera de los ratones infectados con NY-93. El mismo proceso se realizó para la infección con 98-124 y para los órganos extraídos en las infecciones con ambas cepas (no se muestra). Calle 1 (indicado con flecha) control positivo. El resto de las muestras sembradas corresponden a los diferentes días post-infección (dpi). Calle 10: Ladder 100pb (Biodynamics SRL).



**Figura 3.3. Análisis histopatológico de diferentes órganos de ratones BALB/c para el desarrollo del modelo murino.** Se tomaron muestras de los diferentes órganos extraídos a partir de la eutanasia de los animales a los 4 y 7 dpi. Se realizaron cortes histológicos y los mismos fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Ningún individuo, ya sea del grupo control o experimental, presentó lesiones histológicas en ninguno de sus órganos. En la figura se muestran algunos de los órganos evaluados a 4 y 10X donde se observa su estructura conservada.

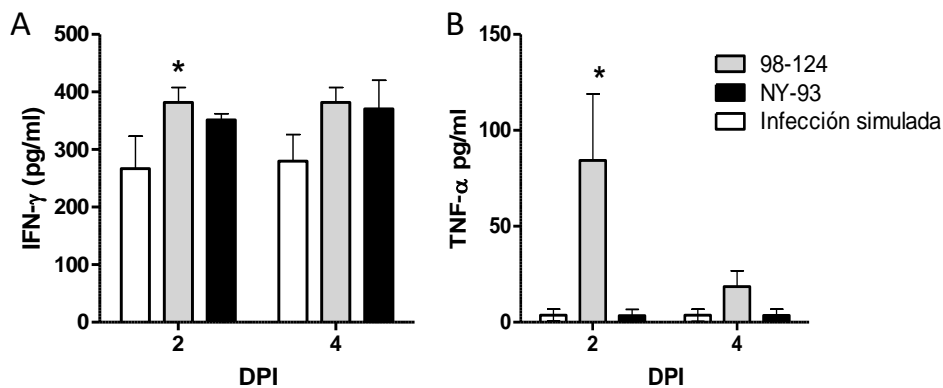
Utilizando las muestras de suero de animales individuales colectadas a los 0, 2, 4 y 7 dpi se determinó la viremia utilizando el ELISA en células que detecta la proteína NS3. También se cuantificaron citoquinas pro y anti-inflamatorias, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , además de la quemoquina MCP-1 utilizando un kit comercial (BD<sup>®</sup> CBA inflammation kit) a los 2 y 4 dpi. Los resultados se muestran en la Figura 3.4 y 3.5. La infección de los ratones con ambas cepas dió lugar a una viremia que se inició a los 4 dpi para la cepa NY-93 y a los 7 dpi para 98-124, que son los primeros tiempos en los que se observan valores significativamente superiores a los del grupo no infectado ( $p < 0,05$ ; Figura 3.4). Los animales infectados no lograron reducir la viremia en el tiempo evaluado. La infección con la cepa de baja virulencia 98-124, indujo un incremento de los niveles sistémicos de TNF- $\alpha$  a los 2 dpi (Figura 3.5) que disminuyen levemente a los 4 dpi. La otra citoquina que mostró diferencias entre los grupos fue IFN- $\gamma$ , que aumentó significativamente respecto del control en animales infectados con 98-124 ( $p < 0,05$ ), mientras que el aumento fue solamente una tendencia para los animales infectados con NY-93 ( $p = 0,052$ ). El resto de las citoquinas evaluadas al igual

que la quimioquina MCP-1 no mostraron diferencias entre los animales infectados y no infectados (no se muestra).



**FIGURA 3.4. Infección de ratones BALB/c con dos cepas del VDVB del genotipo II biotipo no citopático de diferente virulencia.** Viremia medida con el ELISA en células en el suero de ratones para cada dpi y cepa viral inoculada.

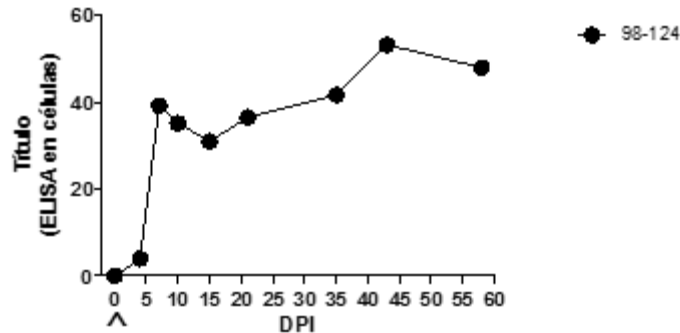
\* $p < 0,05$ , Mann-Whitney Test



**FIGURA 3.5. Citoquinas pro-inflamatorias inducidas por la infección con el VDVB en ratones.** Niveles séricos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a los 2 y 4 dpi en el suero de ratones control e infectados con NY93 y 98-124, según se indica. \* Diferencias significativas respecto de los valores medidos en los animales no infectados,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney Test

Dado que la viremia no se lograba resolver en el periodo evaluado, realizamos un seguimiento de la viremia durante 2 meses en ratones infectados con 98-124. Para la medición de viremia utilizamos “pool” de sueros de 5 animales para cada tiempo y los titulamos por ELISA en células (Figura 3.6). Los resultados muestran que el virus se mantiene en circulación con niveles similares a los detectados a los 7 dpi hasta los 60 dpi y que por tanto estos ratones, quedan infectados de forma persistente, no resuelven la

infección no presentan ninguna signología ni evidencian ningún cambio de peso ni de conducta respecto a los ratones no infectados.



**FIGURA 3.6. Seguimiento de la viremia como resultado de la infección de ratones BALB/c con el VDVB 98-124.** Viremia medida con el ELISA en células en el suero de ratones a lo largo del tiempo hasta los 60 dpi. Se indica el momento de la infección (0 DPI).

### EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS IFN- $\alpha$ Y $\lambda$ EN LA PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN CON LA CEPA DE CAMPO 98-124

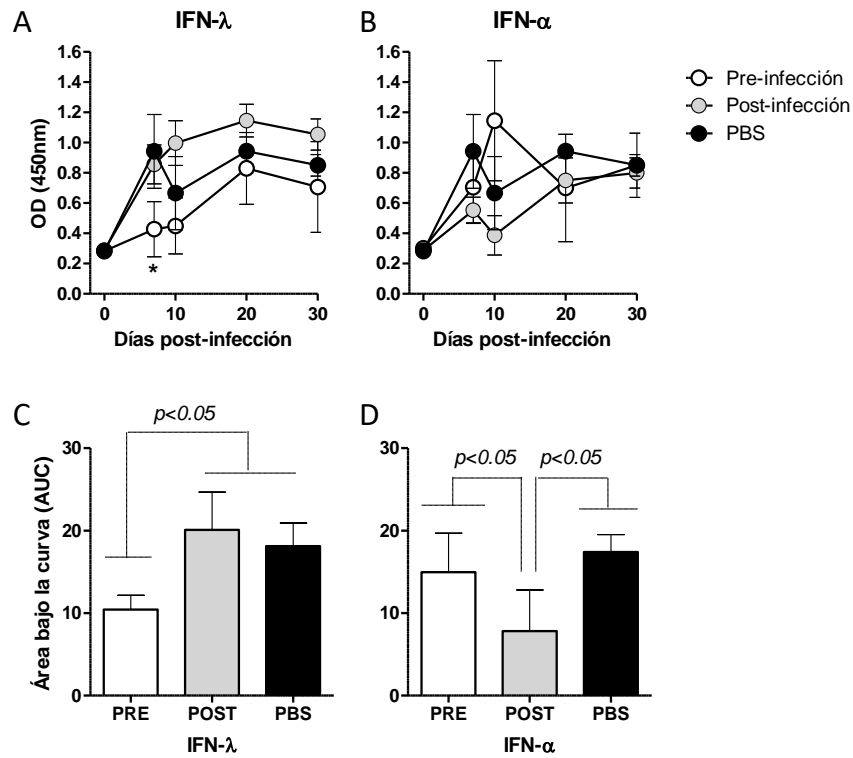
Una vez establecida la capacidad del VDVB de causar viremia en ratones BALB/c realizamos una prueba de concepto para establecer la factibilidad de la eficacia de la utilización de los IFN tipo I y III como bioterapéuticos contra este virus. Para realizar este estudio utilizamos la cepa de campo de tipo II de baja virulencia NCP 98-124, caracterizada en el experimento previo. Esta cepa induce, además de viremia, un pico de TNF- $\alpha$  sistémico a los 2 dpi que permite tener otra evidencia de actividad viral en los animales.

Se utilizaron 5 grupos de 8 ratones que fueron infectados con el VDVB 98-124, considerado día "0 dpi" (Tabla 3.1). Se dejaron además 3 animales como centinelas (no tratados ni infectados). Dos de los grupos recibieron tratamiento profiláctico que constó de una dosis de IFN- $\alpha$  o  $\lambda$  (dosis aplicadas: 250000 U/dosis IFN- $\alpha$ , 2  $\mu$ g/dosis IFN- $\lambda$ ) inyectada por vía sc el día previo a la infección (-1 dpi). Otros dos grupos fueron tratados el día posterior a la infección (+1 dpi) con la misma dosis de IFNs aplicado sc. Los ratones del grupo 5 fueron infectados junto con los otros animales, y recibieron PBS (buffer empleado para diluir los IFNs) los días -1 y +1 por vía sc. Se tomaron muestras de suero a los días 0, 4, 7, 20 y 30 post-infección y se evaluó viremia mediante la detección de NS3 con el ELISA en células. Las dosis evaluadas fueron obtenidas de la bibliografía [106], [147]–[149].

Grupo	Profilaxis Día -1	Tratamiento Día +1
1	IFN- $\alpha$	PBS
2	IFN- $\lambda$	PBS
3	PBS	IFN- $\alpha$
4	PBS	IFN- $\lambda$
5	PBS	PBS

**TABLA 3.1. Tratamientos de ratones BALB/c con IFN- $\alpha$  y  $\lambda$ .** Todos los animales fueron infectados con el VDVB cepa 98-124 (NCP genotipo 2b) por vía IP a los “0 dpi”.

En base a los valores de densidad óptica (DO) obtenidas por el ELISA en células se construyeron curvas de cinética de viremia para cada tratamiento (Figura 3.7). La infección induce un pico de viremia a los 4 dpi, tal como observamos en el experimento anterior, que se mantiene incluso hasta los 30 dpi. La aplicación de IFN- $\lambda$  previa a la infección (curva “PRE”, Figura 3.7 A) reduce la viremia a valores significativamente inferiores a los del grupo sin tratamiento (PBS) a los 7, 10 y 30 dpi ( $p < 0,05$ ), mientras que la aplicación de IFN- $\lambda$  luego de la infección (curva “POST”, Figura 3.7 A), no tiene efecto alguno sobre los valores de viremia medidos. Los resultados obtenidos con IFN- $\alpha$  fueron opuestos (Figura 3.7 B). La viremia se redujo al aplicar el IFN- $\alpha$  el día posterior a la infección, con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a los animales infectados-no tratados a los 10 dpi y el pre-tratamiento no cambió el curso de la viremia. Analizando el área bajo las curvas para cada IFN y tratamiento, que considera los niveles de viremia y la duración de forma integrada, confirmamos que la profilaxis con IFN- $\lambda$  (Figura 3.7 C) y el tratamiento posterior a la infección con IFN- $\alpha$  (Figura 3.7 D) reducen significativamente la viremia producida por la infección experimental de ratones BALB/c con la cepa del VDVB 98-124 aplicada por vía IP.



**Figura 3.7. Efecto de la inmunoterapia con una sola dosis de IFNs recombinantes  $\alpha$  y  $\lambda$  murinos en la viremia.** Ratones BALB/c fueron infectados con el VDVB cepa 98-124. Los mismos fueron tratados con una sola dosis de IFNs recombinantes murinos el día anterior (PRE) o posterior (POST) a la infección. El grupo de ratones infectados que no que recibió inmunoterapia se indica como “PBS”. (A) Cinética de virus en sangre en ratones que fueron tratados con IFN- $\lambda$ . (B) Cinética de virus en sangre en ratones que fueron tratados con IFN- $\alpha$ . (C) Área bajo la curva estimada para cada tratamiento con IFN- $\lambda$ . (D) Área bajo la curva estimada para cada tratamiento con IFN- $\alpha$  (\*)  $p < 0,05$  respecto al grupo PBS, Mann-Whitney.

### EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS IFN- $\alpha$ Y $\lambda$ UTILIZADOS SOLOS O COMBINADOS EN LA PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN CON LA CEPA DE CAMPO 98-124

Habiendo establecido ya la factibilidad del uso de los IFN como bioterapéuticos contra el VDVB, realizamos un experimento en el cuál aumentamos el número de aplicaciones de los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  en las dosis utilizadas anteriormente y combinamos su efecto como preventivos o para tratar la infección. En este experimento se utilizaron 7 grupos de 5 ratones cada uno, que fueron infectados con el VDVB 98-124, considerado día “0 dpi”, como se hizo anteriormente. Se dejaron además 4 animales como centinelas (no tratados ni infectados). Todos los tratamientos se aplicaron dos días antes (-2, -1) y/o dos días después (+1, +2) de la infección. Los detalles del tratamiento realizado a cada grupo se muestran en la Tabla 3.2. La inoculación de los IFNs se realizó por vía sc, en las mismas condiciones que el experimento anterior. Se tomaron muestras de suero a los días 0, 2, 4, 7, 10, 20 y 30 días posteriores a la infección y se evaluó viremia mediante la detección de NS3 en el “ELISA en células”.



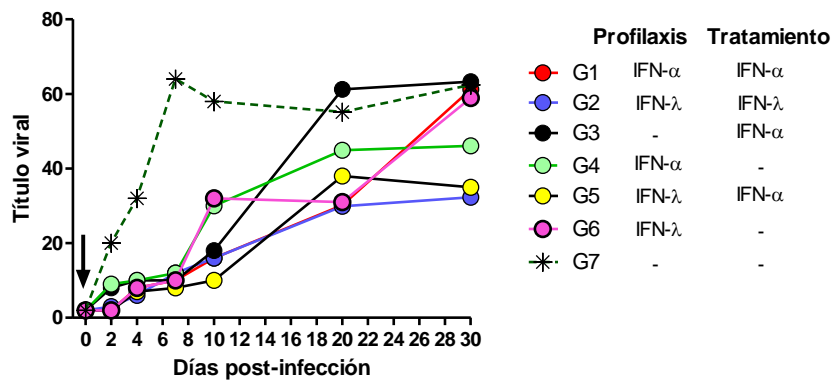
Grupo	Profilaxis	Tratamiento
1	IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$
2	IFN- $\lambda$	IFN- $\lambda$
3	PBS	IFN- $\alpha$
4	IFN- $\alpha$	PBS
5	IFN- $\lambda$	IFN- $\alpha$
6	IFN- $\lambda$	PBS
7	PBS	PBS

**TABLA 3.2. Esquema de tratamientos realizados en ratones BALB/c.** Cada inoculación de IFN se realizó los días -1, -2 y/o +1 y +2. Todos los animales fueron infectados con el VDV B NCP genotipo 2b por vía IP a los “0 dpi”.

### EFFECTO EN LA REDUCCIÓN DE LA VIREMIA

Para realizar una evaluación completa del experimento se conformaron “pooles” de sueros para cada tiempo y se titularon por ELISA en células. Los resultados se muestran en la Figura 3.8.

Los animales del grupo control que recibieron solamente PBS desarrollaron viremia con un pico a los 7 dpi que luego se mantiene en niveles similares hasta los 30 dpi, como estaba descrito (ver más arriba). Por otro lado, todos los grupos que recibieron IFNs en cualquier combinación, mostraron ausencia de virus en sangre, con resultados similares y cercanos a los valores negativos (hasta los 7 dpi). Esta situación de baja viremia se mantuvo hasta los 10 dpi para los ratones de los Grupos 2, 3 y 5. Los valores de viremia fueron menores a los del Grupo 7 (infectados, no tratados) para el resto de los grupos a este tiempo. Hacia los 20 días la viremia aumenta en todos los grupos, alcanzando títulos similares al control infectado-no tratado en casi todos los grupos excepto en aquellos que fueron tratados pre y post-infección con IFN- $\lambda$  o bien recibieron profilaxis con IFN- $\lambda$  (grupo 2) y posterior tratamiento con IFN- $\alpha$  (Grupo 5).



**FIGURA 3.8. Efecto de las distintas combinaciones de aplicación de IFN $\alpha$  en la viremia.** La cinética de virus en los pooles de suero de los animales de cada grupo se calculó mediante diluciones seriadas por ELISA en células. La flecha indica el momento de la infección.

Para poder comparar los distintos grupos se realizó la medición individual de los sueros de los ratones con el ELISA en células (dilución 1:20) a los 0, 4, 7 y 10 dpi. La Tabla 3.3 muestra los valores máximos y mínimos, media, mediana, error y coeficientes de variación (CV) para los valores obtenidos en cada grupo a los 4 y 7 dpi. Los CV fueron muy bajos, mostrando que los animales presentaron valores de viremia muy similares dentro de cada grupo. Los valores obtenidos evidencian diferencias entre el grupo de animales infectados que no recibieron tratamiento y aquellos que fueron inoculados con IFNs.

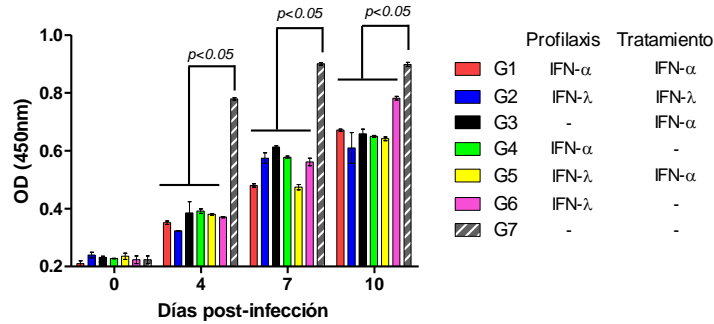
4 dpi	GRUPOS / TRATAMIENTOS							
	NORMAL	G1	G2	G1	G4	G5	G6	G7
	No Inf.	IFN- $\alpha$ /IFN- $\alpha$	IFN-I/IFN-I	No /IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$ / No	IFN-I/IFN- $\alpha$	IFN-I/No	Inf. No trat.
Nro. de datos	4	4	4	4	5	5	5	5
Valor mínimo	0,2250	0,3420	0,3000	0,3410	0,3670	0,3710	0,3650	0,7670
Valor máximo	0,2500	0,3670	0,3240	0,5010	0,4150	0,3870	0,3750	0,7920
Mediana	0,2480	0,3485	0,3165	0,3500	0,3910	0,3820	0,3710	0,7780
Media	0,2528	0,3515	0,3143	0,3855	0,3914	0,3802	0,3708	0,7790
Desvío estándar	0,0271	0,0116	0,0114	0,0771	0,0175	0,0069	0,0040	0,0089
Error estándar	0,0135	0,0058	0,0057	0,0385	0,0078	0,0031	0,0018	0,0040
Coefficiente de variación	13.44%	3.32%	3.64%	20.01%	4.47%	1.84%	1.09%	1.15%

7 dpi	GRUPOS / TRATAMIENTOS							
	NORMAL	G1	G2	G1	G4	G5	G6	G7
	No Inf.	IFN- $\alpha$ /IFN- $\alpha$	IFN-I/IFN-I	No /IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$ / No	IFN-I/IFN- $\alpha$	IFN-I/No	Inf. No trat.
Nro. de datos	4	5	4	4	5	4	4	5
Valor mínimo	0,2250	0,4620	0,4600	0,6050	0,5640	0,4120	0,5390	0,8870
Valor máximo	0,2500	0,4950	0,5930	0,6230	0,5860	0,4870	0,5980	0,9130
Mediana	0,2375	0,4780	0,5255	0,6120	0,5780	0,4395	0,5545	0,9010
Media	0,2375	0,4806	0,5260	0,6130	0,5776	0,4445	0,5615	0,9002
Desvío estándar	0,0123	0,0133	0,0597	0,0085	0,0087	0,0325	0,0259	0,0098
Error estándar	0,0062	0,0059	0,0298	0,0042	0,0039	0,0163	0,0129	0,0044
Coefficiente de variación	5.20%	2.77%	11.36%	1.38%	1.50%	7.32%	4.62%	1.10%

**Tabla 3.3.** Descripción estadística de los valores de viremia obtenidos mediante ELISA en células en animales individuales dentro de cada grupo a los 4 y 7 días post-infección, según se indica.

Al comparar mediante ANOVA de una vía seguido por Bonferroni los resultados de los diferentes tratamientos con los del Grupo 7, se encuentran diferencias significativas a los 4, 7 y 10 días post-infección entre todos los grupos tratados con los diferentes IFNs y esquemas, respecto de los infectados. Estos resultados indican que el tratamiento con los IFNs, independientemente del esquema y del tipo de IFN utilizado, reduce la viremia en los ratones (Figura 3.9).



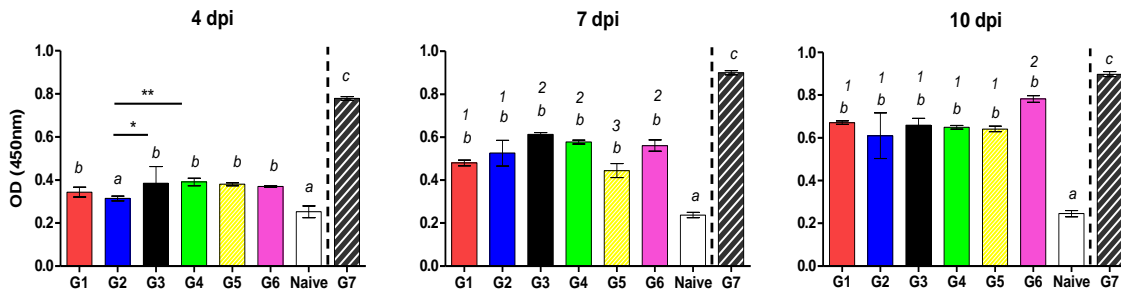
**Figura 3.9.** Niveles detectados de viremia en función de los días post-infección para cada grupo experimental que recibió diferente protocolo de tratamiento según se indica.

Evaluamos luego si existían diferencias entre los niveles de viremia medidos en los ratones que recibieron los distintos tratamientos con IFNs, y entre éstos y el grupo centinela (animales *naïve*) a los 4, 7 y 10 días post-infección. Los resultados se muestran en la Figura 3.10. En todos los casos los valores de viremia en el grupo centinela o tratados con IFNs son significativamente inferiores al medido en animales infectados, no tratados (Grupo 7,  $p < 0.05$ ).

A los 4 dpi el tratamiento doble con IFN- $\lambda$  (Grupo 2) arroja niveles de viremia que son indistinguibles de los valores del grupo *naïve*, considerado como “viremia indetectable”. En todos los otros grupos se detectan niveles muy bajos de viremia, sin diferencias significativas entre sí, pero superiores al grupo *naïve*. Cabe destacar que el doble tratamiento con IFN- $\lambda$  brinda mayor protección que los tratamientos únicos pre (Grupo 4) o post-infección (Grupo 5), con diferencias significativas en los valores de DO medidos ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ; respectivamente).

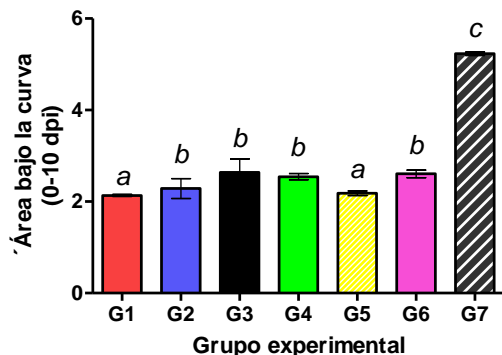
Transcurrida una semana luego de la infección se detecta viremia en todos los grupos evaluados. Comparando los tratamientos entre sí se verifica que los valores más altos de viremia los encontramos en los grupos que recibieron solamente tratamiento pre o post-infección (Grupos 3, 4 y 6); mientras que aquellos animales que fueron tratados pre y post-infección tuvieron menor viremia, independientemente del tratamiento. En este tiempo, los valores de viremia más bajos fueron los de los animales que recibieron profilaxis con IFN- $\lambda$  y tratamiento con IFN- $\alpha$ .

A los 10 dpi, y tal como lo vimos al establecer el modelo, se establece la replicación viral de tipo persistente en todos los animales infectados. En este tiempo, no existen diferencias entre los tratamientos, excepto por el Grupo 6 que presenta mayor viremia que los otros grupos tratados.



**Figura 3.10. Viremia medida en animales individuales.** Los niveles de viremia se midieron por ELISA en células en los ratones de los distintos grupos y en los animales no infectados a los 4, 7 y 10 dpi, según se indica. El análisis ANOVA identificó grupos comparados con los animales naive y entre tratamientos. Las diferencias entre los tratamientos se indican con números y las diferencias con los grupos no tratados, con letras. Letras y números diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Además, a los 4 dpi se encontraron diferencias entre los grupos 2 y 3 ( $* p < 0.05$ ) y entre los grupos 2 y 4 ( $p < 0.01$ ) mediante la prueba de Mann-Whitney.

Para definir cuál de los tratamientos resultó más efectivo en la reducción de la viremia, hicimos un análisis de área bajo la curva considerando los valores individuales tomados entre los 0 y los 10 dpi. De esta forma se estima un valor de área para cada animal y se comparan entre los grupos. Los resultados indican que, como ya verificamos más arriba, todos los tratamientos reducen la viremia respecto del control y que los tratamientos administrados a los grupos 1 y 5 son los más efectivos en la reducción global de la viremia en los tiempos estudiados (Figura 3.11). En base a estos resultados, se evidencia que el tratamiento es más efectivo si se aplica tanto antes como después de la infección y que combinar IFN- $\lambda$  e IFN- $\alpha$  es equivalente a utilizar sólo IFN- $\lambda$  como inmunestimulante y tratamiento.

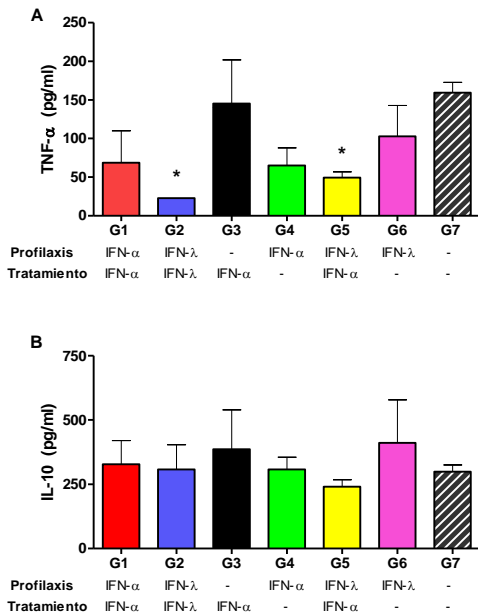


**Figura 3.11. Área bajo la curva estimada para cada tratamiento con IFN $\alpha$  y para el control sin tratar.** Se grafican valores promedio de área bajo la curva estimada para cada animal por grupo experimental. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido por Bonferroni (intervalo de confianza: 95%). Las letras distintas indican diferencias significativas.

**PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS**

La medición de citoquinas pro y anti-inflamatorias se realizó sobre las muestras de suero a los 2 dpi, basándonos en los resultados de la puesta a punto del modelo. De esta manera, el pico de TNF- $\alpha$  se asoció a la infección con la cepa viral utilizada y la determinación de IL-10 respondió a la posibilidad de que el tratamiento antiviral genera un perfil anti-inflamatorio en los animales tratados.

Se midieron las concentraciones de TNF- $\alpha$  e IL-10 por ELISA. Tal como se había visto en la puesta a punto del modelo, los ratones infectados (Grupo 7) responden a la infección mediante la secreción de altos niveles de TNF- $\alpha$ . Se detectaron niveles similares de TNF- $\alpha$  a los del grupo 7 en los animales que recibieron solamente profilaxis con IFN- $\lambda$  (Grupo 6) o solamente tratamiento con IFN- $\alpha$  (Grupo 3). Los animales de los grupos 1 y 4 (ambos recibieron solamente IFN- $\alpha$ ) mostraron valores más bajos que los del Grupo 7 pero las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Se observaron valores de TNF- $\alpha$  sistémico, significativamente inferiores al grupo 7 en los ratones de los grupos 2 y 5, que corresponden a aquellos que recibieron IFN- $\lambda$  como preventivo y tratamiento, o bien profilaxis con IFN- $\lambda$  y tratamiento con IFN- $\alpha$ , respectivamente (Figura 3.12 A). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-10 entre los grupos estudiados (Figura 3.12 B).



**Figura 3.12. Efecto sobre la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-10.** Análisis del efecto de las distintas combinaciones de IFNs para tratamiento de la infección por el VDVB en la producción de citoquinas a nivel sistémico. (A) Niveles séricos de TNF- $\alpha$  por ELISA. (B) Niveles séricos de IL-10. Se grafican valores promedio + SD para cada grupo. \*  $p < 0,05$ , diferencias significativas respecto del grupo 7, Mann-Whitney test.

En conjunto, nuestros resultados muestran que el IFN- $\lambda$  es eficaz contra el VDVB *in vivo*. La aplicación de IFN- $\lambda$  como tratamiento inmunoestimulante reduce la viremia en el modelo murino. Por otro lado, la administración de dos dosis de IFN- $\lambda$ , antes y después de la infección, también reduce la viremia pero su efecto se sostiene en el tiempo.

## RESUMEN

*En este trabajo se ha desarrollado por primera vez un modelo murino que permite establecer viremia luego de la infección por una cepa no citopática aislada en Argentina. El modelo nos permitió además visibilizar diferencias debidas a la virulencia de las cepas virales infectantes, tanto por el tiempo de presentación de la viremia como por el perfil de citoquinas desarrolladas en ambos casos. La infección por el VDVB induce en los ratones una viremia que se prolonga de forma sostenida al menos hasta los 65 días posteriores a la infección. La infección no modifica el aumento de peso corporal natural de cada animal ni se observaron signos clínicos o comportamentales. No se pudo detectar el sitio de replicación del virus ya que no se pudo obtener aislamiento viral ni detección de genoma viral en los órganos evaluados.*

*Una vez establecido el modelo, evaluamos el efecto antiviral de la administración de IFN- $\alpha$  ó  $\lambda$  24 hs antes de la infección (pre-tratamiento) o bien 24 hs después de la infección (tratamiento), medidos como reducción de la viremia. Ambas dosis fueron inoculadas por vía SC. Se incluyeron también los controles pertinentes como un grupo control positivo de infección al que se inoculó con el VDVB cepa 98-124 sin recibir tratamiento alguno, otro grupo control negativo que no fue inoculado con IFNs ni infectado, otro grupo recibió el pre-tratamiento sin infectar y el último recibió el tratamiento y tampoco fue infectado. Los resultados mostraron actividad antiviral para ambos IFNs y efecto significativo en la reducción de la viremia, siendo más eficiente la aplicación profiláctica de IFN- $\lambda$  y la aplicación terapéutica de IFN- $\alpha$ .*

*En un segundo experimento aumentamos el número de aplicaciones de los IFNs en las dosis utilizadas anteriormente y combinamos su efecto como preventivos o para tratar la infección. En este experimento se utilizaron 7 grupos de 5 ratones cada uno, que fueron infectados con el VDVB 98-124, considerado día “0 dpi”, como se hizo anteriormente. Se dejaron además 4 animales como centinelas (no tratados ni infectados). Todos los tratamientos se aplicaron dos días antes (-2, -1) y/o dos días después (+1, +2) de la infección por vía SC. Estos resultados mostraron que los tratamientos son más efectivos cuando se aplican antes y después de la infección. Todos los tratamientos aplicados, independientemente del momento de aplicación y del IFN utilizado reducen la infección respecto del grupo control conformado por animales infectados, pero no tratados. Los tratamientos más efectivos fueron la aplicación de IFN- $\lambda$  pre y post-infección y la aplicación de IFN- $\lambda$  como tratamiento preventivo e IFN- $\alpha$  luego de la infección. En ambos casos se obtiene una reducción significativa de la viremia no solamente respecto del control no tratado sino también comparados con los otros esquemas de tratamiento. El efecto de estos dos tratamientos se sostiene en el tiempo. Además, estos tratamientos reducen la producción de TNF- $\alpha$  a los 2 dpi, un indicador de infección por la cepa utilizada.*

*En conjunto, nuestros resultados muestran que el IFN- $\lambda$  es eficaz contra el VDVB in-vivo y que se obtiene una mayor actividad si se lo utiliza antes y con posterioridad a la infección.*

---

## RESULTADOS - CAPITULO 4

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS INTERFERONES $\alpha$ Y $\lambda$ RECOMBINANTES CONTRA EL VDVB EN BOVINOS

#### OBJETIVOS

- Determinar la seguridad del IFN- $\lambda$ 3 recombinante para la administración en bovinos.
- Realizar una prueba de concepto sobre la factibilidad utilizar el IFN- $\lambda$ 3 bovino recombinante como antiviral para el tratamiento de las infecciones con el VDVB en bovinos.

#### INTRODUCCIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

A partir de los resultados auspiciosos obtenidos *in vitro* e *in vivo* (modelo murino), que demostraron actividad antiviral de los interferones frente al VDVB decidimos evaluar la actividad del IFN- $\lambda$ 3 recombinante (IFN- $\lambda$ r) en terneros. Comenzamos en una primera etapa, realizando estudios *ex vivo* sobre células inmunes bovinas (CMSP) para descartar posible toxicidad o efectos adversos de los IFN $r$  sobre estas células. Por otro lado, se evaluó la actividad antiviral de estos compuestos sobre las CMSP, verificando si eran capaces de impedir la infección con el VDVB. Como se ha reportado en humano y ratón las CMSP no tendrían receptores para los IFN-III y deberían tener efecto antiviral directo con IFN-I [147]. Posteriormente se estableció la seguridad de la dosis a utilizar en bovinos normales por vía subcutánea, a fin de verificar la ausencia de efectos adversos sobre estos animales. Se estableció un protocolo de tratamiento basado en publicaciones previas [111], [134] que sugerían, como tratamiento mínimo, la administración de una dosis diaria de IFN $r$  durante 2 días pre-infección y 2-3 días post-infección. El esquema de trabajo y toma de muestras programadas se describe en el diagrama de la figura M8, sección “Materiales y Métodos”. Una vez establecida la dosis y el intervalo posológico basándonos en los resultados obtenidos con el modelo murino se diseñó un protocolo de tratamiento pre y post-infección con el IFN- $\lambda$ r en terneros. Se presentan a continuación los primeros resultados de la actividad antiviral del IFN- $\lambda$ r contra el VDVB, en este caso frente a la cepa 98-124 (NCP tipo 2, aislamiento local de baja virulencia).

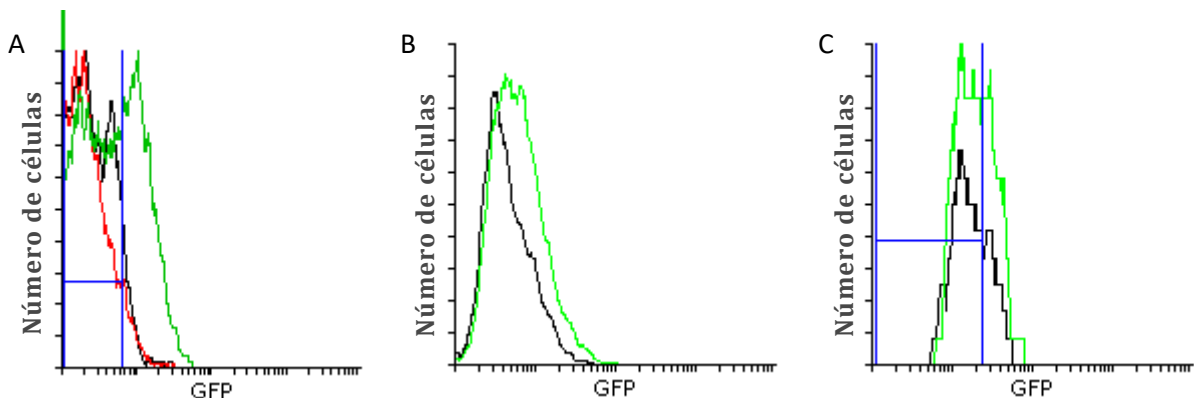
## RESULTADOS

### EVALUACIÓN DE APOPTOSIS EN CMSP TRATADAS CON AMBOS INTERFERONES RECOMBINANTES E INFECTADAS CON EL VDVB

En un primer experimento se evaluó la capacidad del VDVB de infectar CMSP bovinas *ex vivo* y del efecto del tratamiento de los IFN $\alpha$  sobre estas células, sobre todo por los conocidos antecedentes del IFN- $\alpha$  humano en cuanto a su toxicidad sobre células sanguíneas [112], [147].

Para poder cumplir este objetivo se utilizó un virus recombinante producido a partir de un clon infeccioso de la cepa NADL biotipo NCP, que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) al que denominamos VDVB-GFP. Este virus expresa GFP río debajo de NS3, y la secuencia de GFP está flanqueada por la autoporetasa 2A del VFA. Este virus fue desarrollado en colaboración con el Dr. Diego Álvarez de UNSAM en el marco de otro proyecto. En este trabajo se utilizó como modelo para identificar las células infectadas mediante citometría de flujo.

Se realizó un primer experimento infectando células MDBK con el VDVB-GFP y con un virus NCP (98-204) para corroborar que podíamos detectar las células infectadas con el virus recombinante por citometría de flujo. Se detectó GFP a partir de los 3 días post infección (dpi). En la figura 4.1 se muestra un histograma representativo obtenido a los 5 dpi.

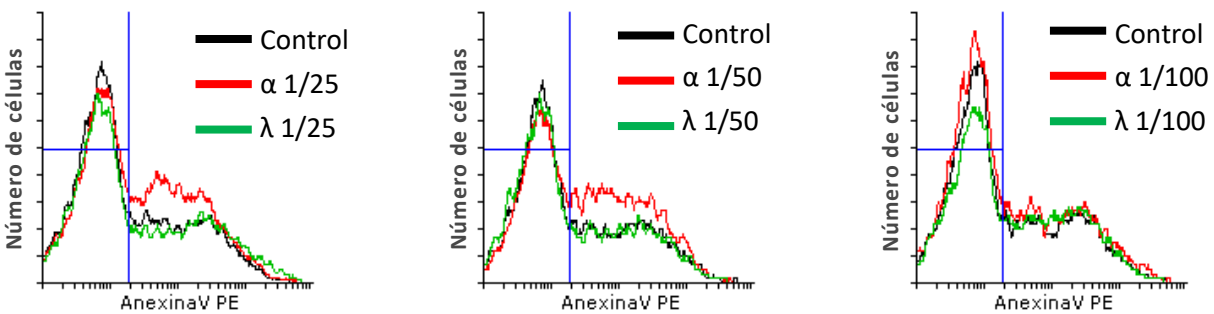


**Figura 4.1.** Histogramas representativos que muestran células MDBK (A) o CMSP totales (B) infectadas con el VDVB-GFP. En el gráfico (C) el histograma se realizó seleccionando la población de CMSP-GFP positivas.

En un segundo experimento se infectaron CMSP bovinas con el VDVB-GFP. Se detectó GFP a partir del primer dpi con un pico a los 2 dpi, que comienza a disminuir a los 3 dpi. Como puede observarse en la figura 4.1, a los 2 dpi muchas células muestran actividad replicativa del virus con una intensidad de fluorescencia baja. Al seleccionar las células GFP positivas (Figura 4.1, C), observamos que no coinciden con las poblaciones de Monocitos-Macrófagos ni con la de Linfocitos, si tenemos en cuenta el tamaño y la granulosidad de la población (no se muestra), probablemente asociado por un cambio de tamaño e incluso formación de sincicios durante la infección.



Para poder estudiar el efecto de los IFN $\alpha$  en la infección viral de CMSP, es necesario establecer si los IFN $\alpha$  en sí mismos poseen algún efecto pro-apoptótico sobre estas células. Esta información es igualmente relevante como parámetro de tolerancia para la utilización posterior de los IFN $\alpha$  en los bovinos. Se realizó un primer experimento en donde los CMSP bovinas fueron tratadas con diferentes diluciones de los IFN $\alpha$ , o bien con diluciones del producto de transfección con un plásmido vacío (tratamiento control). Las células apoptóticas fueron identificadas mediante marcación con anexina V-PE utilizando un kit comercial (Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit, BD Biosciences®) [150] siguiendo las instrucciones del fabricante. Observamos un mayor número de células apoptóticas (Anexina V PE positivas) en los cultivos tratados con IFN- $\alpha$ , y este efecto fue dependiente de la concentración ya que disminuyó al tratar las células con diluciones mayores. En el caso del IFN- $\lambda$  el porcentaje de células apoptóticas no se modifica respecto al medido en las células que recibieron el tratamiento control (Figura 4.2). Estos resultados coinciden con estudios realizados con este tipo de IFN en humanos y ratones, donde se ha comprobado la toxicidad del IFN- $\alpha$  para células sanguíneas y la inocuidad del IFN- $\lambda$  probablemente debido a la ausencia o baja proporción de receptores específicos en estas células [69].



**Figura 4.2.** Histogramas representativos que muestran el grado de apoptosis de CMSP totales tratados con diferentes diluciones de IFN $\alpha$ .

#### EFFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO DE CMSP CON INTERFERONES RECOMBINANTES FRENTE A LA INFECCIÓN CON EL VDVB

Se evaluó la actividad antiviral de los IFN $\alpha$  frente a la infección del VDVB-GFP en CMSP. Dichas células fueron aisladas de sangre entera de bovinos. Se realizó un pre-tratamiento con IFN $\alpha$  y como controles se utilizaron preparaciones de sobrenadantes con plásmido vacío y se dejaron células sin tratar. Finalizado el pre-tratamiento con IFN $\alpha$  o con los controles, las CMSP fueron infectadas a una MOI=0,2. Luego de 48 hs de incubación se determinó la infectividad viral mediante la citometría de flujo, evaluándose el porcentaje de reducción. Como se muestra en la Tabla 4.1 puede observarse que el tratamiento con IFN- $\alpha$ , pero no con IFN- $\lambda$ , reduce el número de CMSP infectadas.

Tratamiento	Factor de reducción (%)
IFN- $\alpha$	45,0
IFN- $\lambda$	6,0
Simulado	0,8

**Tabla 4.1. Efecto los IFNs en el factor de reducción de la infectividad del VDVB en células inmunes bovinas.** CMSP bovinas fueron tratadas por 24h con IFN- $\alpha$  o IFN- $\lambda$  (5 UI/m), según se indica. Se determinó luego cuánto se reduce la infectividad viral respecto de un control de células infectadas, no tratadas. Los valores corresponden a promedios de triplicados. Tratamiento simulado: sobrenadante de células HEK293T transfectadas con pCDNA3 (sin inserto).

### PRUEBA DE SEGURIDAD DE DOSIS DEL INTERFERÓN $\lambda$ 3 RECOMBINANTE EN BOVINOS

El siguiente objetivo de esta etapa fue determinar la seguridad del IFN- $\lambda$ r a utilizar en tratamientos con bovinos y verificar *in vivo* la ausencia de efectos adversos sobre los animales.

Para este estudio se utilizaron 12 terneros del campo experimental de INTA, de 3 meses de edad. Los animales fueron organizados en 4 grupos de 3 animales cada uno. Los terneros del grupo 1 recibieron 6U/kg/día durante dos días de IFN- $\lambda$ r por vía sc en tabla del cuello, los del grupo 2 recibieron 3 U/Kg/día en dos días de IFN- $\lambda$ r por vía sc en tabla del cuello, los del grupo 3 recibieron 1,5 U/Kg/día durante dos días de IFN- $\lambda$ r por vía sc en tabla del cuello y el grupo 4 control recibió medio 1 aplicación por día durante dos días de MEM-D (excipiente del IFN- $\lambda$ r) en el mismo volumen y sitio de inoculación que el resto de los grupos. Los preparados consistían en sobrenadantes de cultivo de células HEK293T conteniendo el IFN- $\lambda$  recombinante y fueron administradas dos dosis con un intervalo posológico de 24 hs. A los 0, 3 y 8 días post-inoculación se tomaron muestras de sangre que fueron remitidas a un laboratorio privado para que se les evaluaran parámetros hematológicos y hepáticos.

Los valores obtenidos para los parámetros hematológicos evaluados indican que la administración de IFN- $\lambda$ r no produce efectos adversos o colaterales en los bovinos, incluso utilizando la dosis más alta (Grupo 1, Tabla 4.2), ya que los valores medidos a los distintos tiempos post-inoculación no difieren de aquellos obtenidos al iniciar el experimento y se encuentran, en todos los casos, dentro de los límites normales establecidos para bovinos de esa raza y edad. Tampoco se vieron alterados los parámetros hepáticos. No se observaron efectos adversos en el sitio de inyección ni se constató ningún signo clínico particular como resultado del tratamiento.

A partir de este resultado se realizó un experimento en bovinos que incluyó el tratamiento con IFN- $\lambda$ r con la mayor dosis evaluada en la prueba de seguridad y el intervalo posológico establecido, esta vez desafiando al animal con el VDVB, cepa 98-124 que ya había sido caracterizada en una tesis anterior de nuestro grupo de trabajo y cuyos detalles se encuentran publicados [133].

	# ANIMAL	GRUPO	HTO (%)	GR (/mm3)	GB (/mm3)	Hb (%)	Plaq (/mm3)	VCM (fl)	HCM (%)	CHCM (g/dl)	Urea (mg/dl)	Creat (mg/dl)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	FAS (U/l)	Prot tot (g%)	Alb (g%)	BT (mg/dl)	BD (mg/dl)	GTγ (U/l)
DÍA 0	406	1	43	11900000	16500	15,8	750000	36,3	13,2	36,4	19	1,17	19	62	211	6,5	3,3	0,5	0,1	18
DÍA 3	406	1	41	11100000	12700	14,3	790000	36,6	12,8	35,1	15	0,79	18	78	218	6,7	3,5	0,5	0,1	17
DÍA 8	406	1	41	11500000	12500	14,6	780000	36,5	13	35,4	16	0,82	18	75	220	6,5	3,5	0,5	0,1	17
DÍA 0	393	1	40	11300000	17200	14,6	627000	35,4	12,9	36,5	18	1,3	21	70	169	6,9	3,1	0,5	0,1	15
DÍA 3	393	1	39	11020000	18000	13,8	654000	35,2	12,6	35,9	23	0,86	25	88	172	6,9	3,3	0,7	0,1	16
DÍA 8	393	1	39	11020000	18100	14,2	541000	35,3	12,8	36	19	0,87	22	91	172	6,4	3,1	0,7	0,1	15
DÍA 0	404	1	39	11700000	10700	14	700000	32,9	12	36,5	18	1,13	21	57	173	6,3	3,2	0,4	0,1	16
DÍA 3	404	1	37	10200000	17800	13,1	746000	36,27	12,84	35,1	19	0,78	22	76	158	6,5	3,5	0,6	0,1	23
DÍA 8	404	1	38	11500000	17600	13,5	710000	35	12,5	35,5	19	0,8	21	65	155	6,5	3,3	0,4	0,1	21
DÍA 0	410	2	37	10600000	5600	13,4	750000	34,6	12,6	36,4	12	1,02	16	79	219	6,1	2,9	0,4	0,1	20
DÍA 3	410	2	36	10400000	8900	12,6	749000	34,9	12,1	34,8	12	0,72	17	101	275	6,4	3,1	0,6	0,1	20
DÍA 8	410	2	36	10500000	7500	12,7	750000	34,8	12,3	35,1	13	0,75	17	105	300	6,1	3	0,6	0,1	20
DÍA 0	398	2	31	7460000	17800	10,5	266000	41,7	14,1	33,9	17	1,15	18	55	105	6,2	3	0,5	0,1	16
DÍA 3	398	2	31	7480000	14200	10,6	460000	41,2	14,1	34,3	20	0,87	19	68	126	6,2	3,2	0,6	0,1	16
DÍA 8	398	2	31	7500000	15600	10,5	450000	41,5	14,2	34,1	21	0,85	19	71	130	6,3	3,1	0,5	0,1	15
DÍA 0	400	2	42	11800000	24000	15,6	740000	35,6	13,2	37,1	21	1,24	20	68	225	6,4	3,2	0,4	0,1	16
DÍA 3	400	2	40	10100000	16800	14,4	672000	39,6	14,26	36	24	0,93	18	111	219	6,3	3,3	0,5	0,1	16
DÍA 8	400	2	40	10200000	17000	14,4	720000	39	14,1	36,4	21	0,95	18	115	219	6,4	3,3	0,5	0,1	16
DÍA 0	409	3	41	11800000	16800	14,8	780000	34,5	12,5	36,4	18	1,08	13	57	277	6,5	3,3	0,5	0,1	27
DÍA 3	409	3	41	11600000	17000	14,5	750000	34,6	13,1	36,2	19	0,78	15	68	275	6,4	3,1	0,5	0,1	25
DÍA 0	411	3	35	11500000	20000	13	750000	30,8	11,4	36,9	15	1	12	54	280	6,2	3,2	0,4	0,1	17
DÍA 3	411	3	35	11200000	19000	12,7	800000	30,9	11,4	36,8	21	0,78	20	68	300	6,2	3,4	0,8	0,1	17
DÍA 8	411	3	35	11200000	19000	12,8	790000	30,8	11,4	36,9	18	0,78	17	55	295	6,3	3,2	0,6	0,1	17
DÍA 0	408	3	40	11800000	14500	15,2	780000	34	12,9	37,9	18	1,44	15	58	212	6,5	3,2	0,6	0,1	15
DÍA 3	408	3	40	12000000	14100	15,1	800000	33,8	12,7	37,4	19	0,91	15	63	212	6,3	3,2	0,6	0,1	15
DÍA 8	408	3	39	12000000	14200	15,1	800000	33,9	12,8	37,5	19	0,91	21	78	234	6,7	3,5	0,5	0,1	16
DÍA 0	412	4	40	11500000	15700	14,5	690000	35	12,6	36,2	21	1,02	12	61	245	6,6	3,4	0,5	0,1	24
DÍA 3	412	4	38	10800000	13800	13,6	821000	35,2	12,6	35,9	23	0,79	11	92	274	6,4	3,6	0,7	0,1	22
DÍA 8	412	4	40	11000000	13900	13,9	800000	35,1	12,5	36,1	21	0,81	11	95	250	6,4	3,4	0,7	0,1	22
DÍA 0	399	4	39	11000000	8100	14,1	813000	35	12,8	36,6	15	1,1	21	76	282	6,3	3,2	0,6	0,1	18
DÍA 3	399	4	36	10200000	8000	12,6	540000	34,9	12,4	35,4	17	0,77	22	88	293	6,5	3,4	0,6	0,1	17
DÍA 8	399	4	38	10500000	8000	13,1	600000	35	12,5	35,9	17	0,78	22	90	300	6,3	3,4	0,6	0,1	16
DÍA 0	396	4	39	11000000	15900	14,5	700000	35,1	13,2	37,5	17	0,98	18	65	159	6,8	3,3	0,4	0,1	16
DÍA 3	396	4	38	10600000	15600	13,6	641000	35,4	12,8	36,6	21	0,78	20	68	188	6,8	3,4	0,7	0,1	20
DÍA 8	396	4	39	10600000	15500	14,1	650000	35,3	13	36	20	0,78	19	65	210	6,8	3,3	0,6	0,1	17

**Tabla 4.2.** Resultados del hemograma y hepatograma realizado a los 12 bovinos los días 0, 3 y 8 de la prueba de seguridad de IFN- $\lambda$ r.

VALORES DE REFERENCIA	
HTO (%)	24 a 46
GR (/mm3)	4 a 10 X 10 <sup>6</sup>
GB (/mm3)	4000 a 12000
Hb (%)	8 a 15
Plaq (/mm3)	100000 a 800000
VCM (fl)	40 a 60
HCM (%)	11 a 17
CHCM (g/dl)	30 a 36
Urea (mg/dl)	7,8 a 25
Creat (mg/dl)	0,6 a 1,8
GPT (U/l)	6,9 a 38
GOT (U/l)	78 - 132
FAS (U/l)	hasta 490
Prot tot (g%)	6,2 a 8,2
Alb (g%)	2,8 a 3,9
BT (mg/dl)	hasta 0,8
BD (mg/dl)	hasta 0,2
GTγ (U/l)	4,9 a 26

*El Manual MERCK de Veterinaria. Quinta Ed. 2000*  
*Valores de referencia de química sanguínea de bovinos. INTA Balcarce. Lic. Bioquímica Susana B. Cseh. 2013*

## PRUEBA DE EFICACIA DEL INTERFERON $\lambda$ 3 RECOMBINANTE EN BOVINOS

Se utilizaron 6 bovinos hembra de la raza Holstein de 3 semanas de edad y un peso vivo promedio de 54,5 Kg al inicio de la experiencia, provenientes de un establecimiento lechero del departamento de Salta capital.

La primera maniobra realizada fue la extracción de muestras de sangre periférica a partir de la vena yugular de 22 animales del establecimiento para determinar la presencia de antígeno p80 y de Anticuerpos contra p80 en suero. Se seleccionaron 6 animales negativos para ambas determinaciones (Tabla 4.3).

Muestra	AC anti P80	Ag P80
1	P	N
2	N	N
3	P	N
4	P	N
5	P	N
6	P	N
7	P	N
8	N	N
9	N	N
10	P	N
11	P	N
12	N	N
13	N	N
14	N	N
15	N	N
16	N	N
17	N	N
18	N	N
19	N	N
20	N	N
21	N	N
22	N	N

**Tabla 4.3.** Resultados de determinaciones de anticuerpos contra P80 (AC contra P80) y antígeno P80 (Ag P80). P: positivo; N: negativo. Se resaltan los animales negativos y se indican con flechas aquellos incluidos en el estudio.

Los 6 animales seleccionados fueron asignados aleatoriamente a dos grupos experimentales, 4 terneros conformaron el grupo 1 (asignados al tratamiento) y los otros 2 terneros, el grupo control (no tratados). Los animales del grupo 1 recibieron dos dosis de IFN- $\lambda$ r los días -2 y -1 post-infección, fueron infectados al día “0” del experimento y se les volvió a inyectar IFN- $\lambda$ r los días +1 y +2. Los animales del grupo control recibieron medio de cultivo (el vehículo del IFN- $\lambda$ r) en los mismos tiempos que los otros fueron inoculados con IFN- $\lambda$ r. La infección se realizó el mismo día para ambos grupos, y se realizó mediante instilación nasal utilizando un aspersor manual (5 ml de medio de cultivo con una concentración final de  $1 \times 10^6$  DITC50/ml de VDVB cepa 98-124). Las inoculaciones del virus se realizaron por la vía nasal. Los animales se mantuvieron en estaca, con alimentación suplementada y alejados 5 metros uno de otro para evitar el contagio.

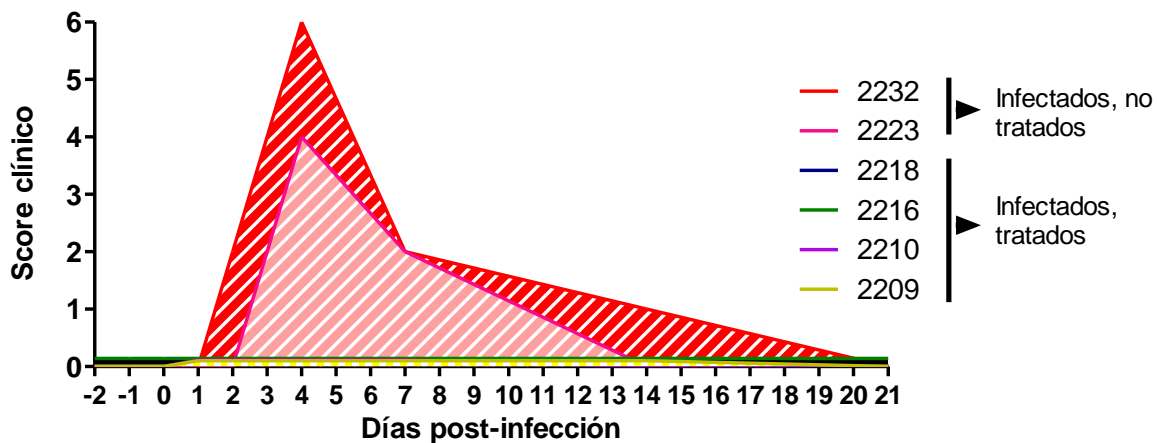
### SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA

Los terneros incluidos en el grupo no tratado desarrollaron la enfermedad con síntomas respiratorios, tal y como se ha descrito. Cursaron con fiebre leve, iniciando el cuadro clínico a los 2 dpi con tos y secreción nasal serosa, que pasó a ser amarillenta a los 4 dpi. En este tiempo se auscultaron “rales” pulmonares húmedos en un animal, tos sin “rales” en el otro, anorexia y fiebre en ambos. A los 7 dpi comenzó a disminuir la secreción nasal, continuando

la tos y la anorexia. A la semana siguiente, los signos respiratorios habían desaparecido, manteniéndose la anorexia en uno de los terneros.

Los terneros tratados con el IFN- $\lambda$ r producido en el transcurso de esta tesis no presentaron signos clínicos evidentes durante todo el ensayo, solamente un animal presentó una febrícula el día 7 post-infección.

En base a la tabla de puntuación asignada a signos clínicos presentada en la sección de materiales y métodos (Tabla M2) se calculó un “score clínico” para los animales tratados y no tratados. Los animales que no recibieron el compuesto llegaron a un score clínico máximo de “6” a los 4 dpi, iniciando la signología a los 2 dpi y manteniéndose hasta los 14 dpi. Los animales tratados con IFN- $\lambda$ r no presentaron síntomas clínicos por lo que su “score” fue “0” durante las tres semanas que se mantuvo el seguimiento veterinario (Figura 4.3).



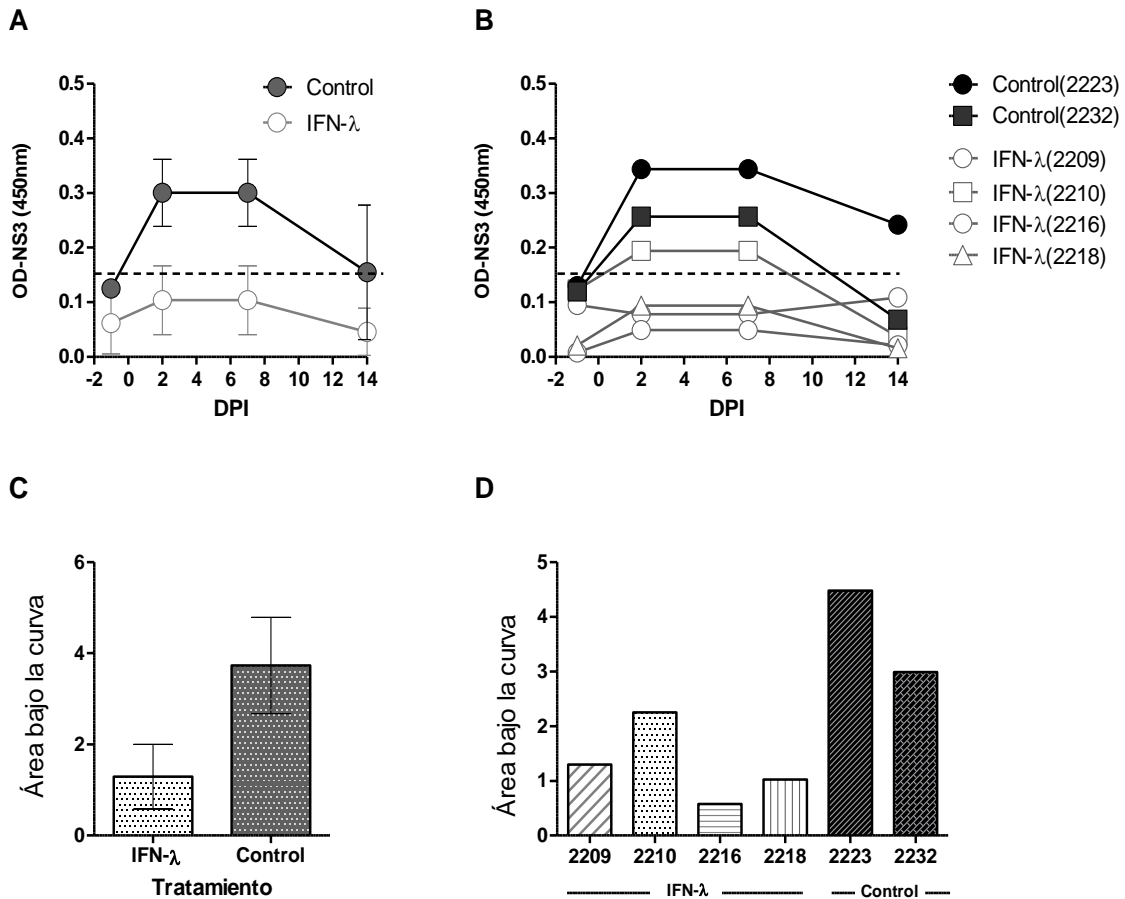
**Figura 4.3. Signología clínica causada por la infección con el VDVB 98-124.** Curva de score clínico de los animales infectados que recibieron o no tratamiento con IFN- $\lambda$ r, según se indica.

## VIREMIA

A fin de establecer la capacidad del IFN- $\lambda$ r de proteger a los animales de la infección por el VDVB, evaluamos la presencia de virus en sangre utilizando un kit comercial para detectar la proteína no estructural NS3, altamente conservada. En un primer intento la medición se realizó usando el ELISA en células, pero dada la calidad de las muestras tomadas a campo, en algunos casos se contaminaron los cultivos.

Las muestras de suero fueron evaluadas diluidas al medio en el buffer del kit. Se graficaron los valores de DO promedio para cada grupo (Figura 4.4 A) y las curvas individuales (Figura 4.4 B). Los dos animales del grupo control mostraron viremia a los 2 y 7 dpi, que luego se resuelve encontrándose valores negativos a los 14 dpi. Tres de los cuatro animales tratados con IFN- $\lambda$ r no desarrollaron viremia. En estos animales los valores fueron negativos para todos los tiempos medidos. Uno de los animales tratados con IFN- $\lambda$ r desarrolló una viremia con valores más bajos a los del grupo no tratado. Esto se visualiza claramente al estimar el área bajo la curva. La Figura 4.4 C muestra los valores promedio del área bajo la curva para ambos grupos, revelando claramente que la viremia es menor en el grupo que recibió el

tratamiento con IFN-λr. Las áreas individuales (Figura 4.4 D) evidencian el efecto del tratamiento por animal, y compara la viremia extendida (-1 a 14 dpi), mostrando que solamente el animal nro. 2 de los tratados desarrolló viremia, aunque menor a los infectados-no tratados. La viremia se correlacionó con los signos clínicos únicamente en los animales que no fueron tratados con IFN-λr.



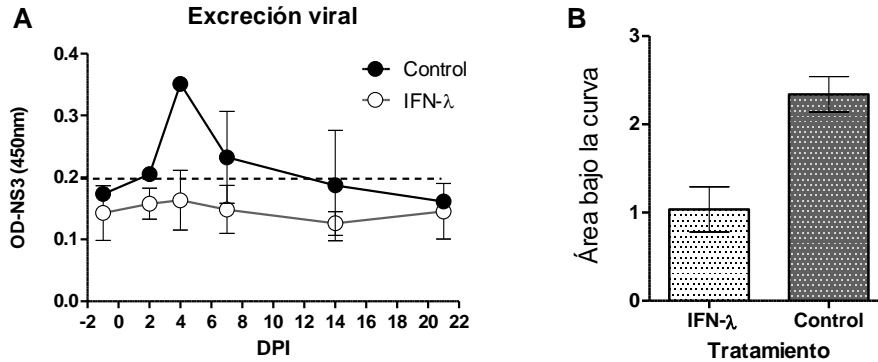
**Figura 4.4.** Cinética de la viremia en terneros tratados con IFN-λr. La viremia se determinó utilizando un ELISA comercial para la detección de NS3 en muestras tomadas entre los días -1 (pre-infección) y 14 post-infección. La línea de puntos horizontal indica el valor de DO correspondiente al punto de corte de la técnica. (A) Promedio de valores de DO ± DS para los animales infectados, tratados o no (control) con IFN-λr. (B) Curvas de DO de viremia para cada animal. (C) Área bajo la curva. Valores promedio de DO ± DS. (D) Valores individuales de área bajo la curva.

## EXCRECIÓN VIRAL

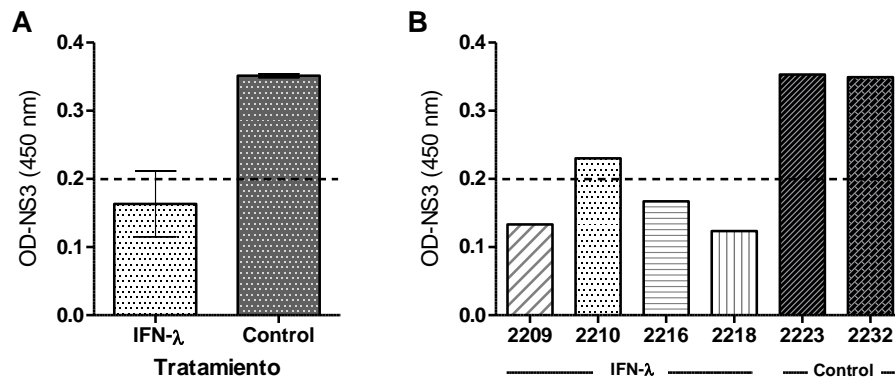
La determinación de excreción viral se realizó a partir de los hisopados nasales tomados antes y después de la infección. Las determinaciones de virus infeccioso se hicieron mediante ELISA en células a partir de una dilución al medio de las muestras.

Los animales infectados que no recibieron tratamiento presentaron excreción viral nasal a los 4 dpi (Figura 4.5 A). Uno de los dos animales mantuvo la excreción hasta el día 7 post-

infección. Considerando los valores promedio, los animales tratados con IFN- $\lambda$ r no presentaron excreción viral y el área bajo la curva de la cinética de la medición de virus infeccioso en secreciones nasales fue superior en animales tratados respecto de los no tratados (Figura 4.5 B).



**Figura 4.5. Excreción viral en bovinos infectados.** (A) Cinética de la excreción viral en los bovinos infectados, tratados o no (control) con IFN- $\lambda$ r, medidos por ELISA en células. La línea de puntos horizontal indica el valor de DO correspondiente al punto de corte de la técnica. (B) Área bajo la curva (valores promedio  $\pm$  DS).



**Figura 4.6. Excreción viral en secreciones nasales a los 4 días post-infección.** (A) Valores promedio de excreción viral  $\pm$  DS en los bovinos infectados, tratados o no (control) con IFN- $\lambda$ r, medidos por ELISA en células. La línea de puntos horizontal indica el valor de DO correspondiente al punto de corte de la técnica. (B) Valores de excreción individuales.

Analizando los datos en el pico de excreción viral, a los 4 dpi, podemos observar los valores de DO del grupo tratado son, en promedio, negativos mientras que son positivos para el grupo no tratado (Figura 4.6). Al analizar los valores individuales, se observa que tres de los cuatro animales tratados no excretaron virus, mientras que uno de ellos, el mismo que presentó viremia, muestra un valor de DO positivo, aunque cercanos al punto de corte de la técnica.

### PRODUCCIÓN ANTICUERPOS CONTRA EL VDVB Y DE CITOQUINAS PRO Y ANTI-INFLAMATORIAS

Los terneros infectados con 98-124 suelen desarrollar anticuerpos contra la proteína no-estructural NS3 hacia los 21 dpv. La presencia de anticuerpos en este tiempo indica que hubo infección viral. Por otro lado, una modificación en la cinética de inducción de estos anticuerpos podría deberse a un efecto inmunomodulador del tratamiento aplicado. La presencia de anticuerpos anti-NS3 fue evaluada mediante un kit comercial y se clasificaron los sueros en positivos, dudosos o negativos según los puntos de corte establecidos por el fabricante.

Ninguno de los animales infectados desarrolló anticuerpos anti NS3 a los 14 dpi (Tabla 4.4). Sin embargo, a los 20 dpv, se detectaron anticuerpos específicos en uno de los animales tratados y en uno de los no tratados, mientras que el otro animal control arrojó resultado “dudoso”, estando al límite del positivo.

Animal	Tratamiento	14 dpi	21 dpi
2209	SI	83,4	60,2
2210	SI	61,2	31,3
2216	SI	74,4	60,0
2218	SI	73,6	51,6
2223	NO	79,9	31,5
2232	NO	74,6	47,2

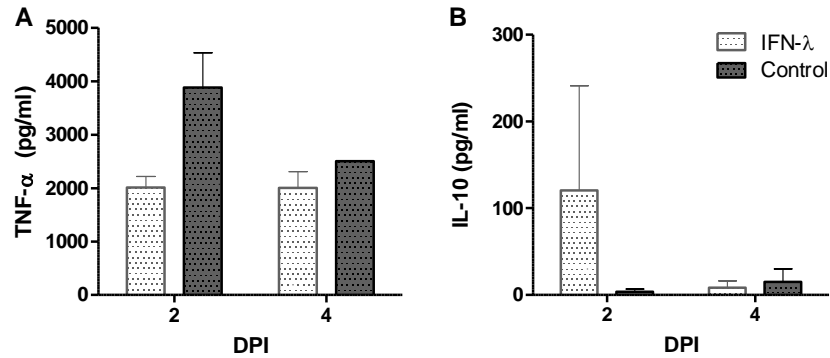
**TABLA 4.4.** Anticuerpos anti-VDVB en los terneros infectados. La presencia de anticuerpos séricos anti-P80 fue determinada utilizando un kit comercial a los 14 y 20 dpi. Los resultados en este ELISA de bloqueo se expresan en porcentajes. Se consideran positivos los valores menores o iguales a 40 (indicados en rojo) y negativos los mayores o iguales a 60 (en negro). Los valores intermedios entre estas referencias se informan como “dudosos” (marcados en azul).

La infección con la cepa del VDVB 98-124 produce un aumento en los niveles sistémicos de los ratones infectados a los 2 dpi. Resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo, revelan que terneros privados de calostro infectados con esta cepa aumentan la expresión de TNF- $\alpha$  entre los 2 y 4 días post-infección, medidos por RT-qPCR a partir de mensajeros extraídos de células mononucleares de sangre periférica. Por otro lado, existen reportes que destacan la capacidad del IFN- $\lambda$  de inducir un perfil anti-inflamatorio, que no pudo ser corroborado en el modelo murino. Basados en estos resultados medimos la concentración de TNF- $\alpha$  e IL-10 por ELISA en el suero de los terneros infectados, tratados y no tratados con IFN- $\lambda$ r, a los 2 y 4 dpi.

Los terneros infectados del grupo control presentan un pico de TNF- $\alpha$  sistémico a los 2 dpi que desciende a los 4 dpi (Figura 4.7 A). Estos animales no poseen niveles séricos detectables de IL-10 (Figura 4.7 B). Los animales tratados con IFN- $\lambda$ r no presentan este aumento de TNF- $\alpha$  a los 2 dpi, y los valores no varían a los 4 días. Sin embargo, el



tratamiento con IFN- $\lambda$ r induciría un incremento en la concentración sistémica de IL-10. Este efecto se verifica en todos los animales tratados con excepción del ternero nro. 2210 que es el mismo en el que se detectó viremia (no se muestra).



**Figura 4.7. Niveles séricos de citoquinas en los terneros infectados.** En las muestras de suero obtenidas a los 2 y 4 días posteriores a la infección, se cuantificaron las citoquinas TNF- $\alpha$  (A) e IL-10 (B) utilizando un ELISA comercial. Se muestran las concentraciones promedio + DS medidas para cada citoquina.

## RESUMEN

El IFN puede administrarse en bovinos solo si antes se comprueba la ausencia de toxicidad o efectos adversos tanto locales como sistémicos. En una primera etapa se evaluó el efecto de los IFNr sobre las CMSP bovinas, *ex vivo*. Comprobamos que el IFN- $\lambda$ r no produce apoptosis en este tipo celular a ninguna de las concentraciones evaluadas, en cambio el IFN- $\alpha$  induce apoptosis de un 15-20% de las CMSP en la concentración más alta ensayada. Este fue un primer paso para suponer que el IFN- $\lambda$ r no generaría efectos indeseados sobre los valores hematológicos de los animales que recibieran tratamiento. Otro ensayo sobre este mismo tipo celular en donde se pretrató con los IFNr y luego se infectó con VDVB no mostró reducción de la infectividad por parte de IFN- $\lambda$ r, resultado que se condice con la propuesta de que las células sanguíneas de bovinos no tendrían receptores y/o receptores disfuncionales para este IFNr.

Los resultados *ex vivo* permitieron continuar con la siguiente fase en la que se evaluó la seguridad posológica del IFN- $\lambda$ r producido en el laboratorio. Se determinó que la mayor concentración evaluada (6 U/Kg) es segura *in vivo* ya que no se detectaron alteraciones en los parámetros hematológicos controlados. Teniendo ya la dosis de IFN- $\lambda$ r establecida, el paso siguiente fue la evaluación de la actividad antiviral del IFN- $\lambda$ r contra el VDVB en bovinos. Como se describe más arriba se realizó una prueba de concepto en la que 4 terneras de la raza Holstein de 3 semanas de edad fueron infectadas con la cepa del VDVB 98-124 de baja virulencia luego de haber sido tratadas con 2 dosis de IFN- $\lambda$ r 2 días antes de la infección y luego recibieron otras dos aplicaciones de IFN- $\lambda$ r durante los dos días posteriores a la misma. Otros dos animales fueron solo infectados y en lugar de administrarles IFN- $\lambda$ r se les inóculo medio de dilución en el mismo volumen y sitio de inyección que el grupo tratado. Se tomaron muestras de sangre los días: -2, 2, 4, 7, 10, 14

y 21 pi y muestras de hisopados nasales los días: -2, 2, 4, 7 y 14. A partir del suero se determinó viremia y las concentraciones de IL-10 y TNF- $\alpha$ . Se cuantificó la excreción viral a partir de los hisopados nasales. Los terneros fueron también monitoreados para establecer el score clínico a lo largo todo el ensayo y poder comparar los resultados obtenidos entre los diferentes grupos.

Los animales que no recibieron el IFN- $\lambda$ r marcaron un score clínico máximo de “6” a los 4 dpi, iniciando la signología clínica a los 2 dpi. En uno de los animales los signos se mantuvieron hasta los 14 dpi. Los terneros tratados con IFN- $\lambda$ r no presentaron síntomas clínicos por lo que su “score” clínico fue “0”. La viremia fue menor en el grupo que recibió el tratamiento con IFN- $\lambda$ r. Únicamente uno de los terneros tratados desarrolló viremia, aunque con un valor menor a los infectados-no tratados. En cuanto a la excreción viral, los animales infectados que no recibieron tratamiento presentaron virus en las secreciones nasales a los 4 dpi. Uno de los dos animales mantuvo la excreción hasta el día 7 post-infección. Considerando los valores promedio, los animales tratados con IFN- $\lambda$ r no presentaron excreción viral. Al analizar los valores individuales, se observa que tres de los cuatro animales tratados no excretaron virus, mientras que uno de ellos, el mismo que presentó viremia, muestra un valor de DO positiva, aunque cercano al punto de corte de la técnica. Los terneros infectados del grupo control presentan un pico de TNF- $\alpha$  sistémico a los 2 dpi que desciende a los 4 dpi. Estos animales no poseen niveles séricos detectables de IL-10. Por otro lado, los animales tratados con IFN- $\lambda$ r no presentan este aumento de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, el tratamiento con IFN- $\lambda$ r induciría un incremento en la concentración sistémica de IL-10. Este efecto se verificó en todos los animales tratados con excepción del ternero nro. 2210 que es el mismo en el que se detectó viremia.

---

## DISCUSIÓN

Los interferones son citoquinas producidas y liberadas por las células en respuesta a la infección por patógenos, como virus, bacterias y parásitos. Los IFN son especialmente importantes para combatir las infecciones virales [64]. En el caso de los virus con genoma de ARN, como el VDVB, la producción de IFN de tipo I y tipo III se inicia en respuesta a la detección de la infección mediante varios receptores tipo toll [151], [152], incluidos TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 y TLR8 [153]. Otros receptores de reconocimiento de patrones incluyen los receptores tipo I (RIG-I) inducibles por el ácido retinoico (RLR) y el gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5), que se encuentran en el citoplasma y reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [154]. Más recientemente, los receptores similares a los dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), (NLR) también se han implicado en la inducción de IFN de tipo I después de la infección por virus ARN [155], [156]. La inducción de IFN se controla a nivel transcripcional mediante la unión de los factores reguladores de IFN (IRF), además de otros factores de transcripción a promotores específicos. Se ha demostrado que IRF3 e IRF7 desempeñan funciones cruciales en las vías de producción de IFN tipo I mediadas por RIG-I, MDA5 y TLR [9], [154], [157]. La inducción de IFN de tipo III en respuesta al virus y la estimulación de TLRs, RIG y MDA se realiza de manera similar a la inducción de IFN de tipo I, aunque su efecto se ejerce principalmente sobre células epiteliales, debido a la localización de sus receptores.

El VDVB es un virus de alto impacto económico que infecta al ganado. Pertenece a la familia *flaviviridae* del género *pestivirus*, y se transmite por ingestión, inhalación y contacto, pudiendo ocurrir tanto la transmisión vertical como la horizontal [119]. El resultado de la transmisión horizontal durante la infección por el VDVB en las vacas preñadas depende no solo del biotipo y la virulencia del virus infeccioso, sino también de la etapa gestacional en el momento de la infección. La infección fetal puede provocar la muerte y el aborto, la inmunotolerancia y la generación de terneros con infección persistente o defectos congénitos del desarrollo.

La producción de IFNs *in vivo* después de la infección por VDVB NCP de animales inmunológicamente vírgenes para este virus es diferente de la descrita *in vitro*. La producción de IFN tipo I está inhibida en la mayoría de las células hematopoyéticas y no hematopoyéticas infectadas con el VDVB NCP [30], [158]. Las publicaciones más recientes que examinan este mecanismo utilizando no sólo VDVB sino también CSFV demuestran que estos virus codifican bloqueos activos para la inducción de IFN de tipo I. Algunos de estos mecanismos están dirigidos por dos proteínas: la proteasa N-terminal (Npro) que dirige tanto a IRF3 como a IRF7 para la degradación del proteasoma [159] y Erns, que es una glicoproteína con actividad ARNasa que inhibe la vía de señalización inductiva del ARN de doble cadena intermediario de replicación viral [160]. Sin embargo, durante la fase aguda de la infección con VDVB o CSFV, se puede detectar IFN de tipo I biológicamente activo en el suero de los animales. Para el CSFV, las células responsables de producir grandes cantidades de IFN se identificaron como células dendríticas plasmocitoides “pDC” [161], [162]. Otros estudios detectaron un IFN ácido-lábil y la inducción de la producción de IFN de tipo III (IL-28B) a partir de pDC recolectados de tejidos en respuesta al VDVB *ex vivo*

[71], [129]. Estas evidencias apoyan el uso de los IFN para el control de las infecciones por este virus *in vivo*.

La vacuna actual contra el VDVB no confiere protección hasta al menos 2 a 3 semanas después de la vacunación, y sobre todo las vacunas inactivadas, requieren al menos dos dosis para ser efectivas [163]. Por tanto, incluso los animales vacunados son susceptibles al VDVB durante largos periodos. En los últimos años, la OIE ha reconocido que para tener éxito, los programas de control de diversas infecciones virales deberían incluir el uso de antivirales y / o moléculas inmunomoduladoras que, además de las nuevas vacunas marcadoras que se desarrollen (permitiendo diferenciar animales vacunados de infectados), controlarían rápidamente la enfermedad antes del inicio de la respuesta inmune adaptativa inducida por la vacuna [164]. En todos los vertebrados, la expresión de los IFN constituye el primer paso en la respuesta inmune contra la infección viral y, de hecho, la administración de IFN como agentes bioterapéuticos ha sido eficaz para controlar varias infecciones virales [165]–[167]. En el caso del virus de la fiebre aftosa, la aplicación de IFN- $\lambda$  bovino demostró que retrasa la enfermedad y reduce los signos clínicos.

En este escenario, y con el objetivo de desarrollar un producto bioterapéutico recombinante de aplicación en bovinos, desarrollamos IFNr bovinos que expresamos en células de mamífero, y evaluamos su eficacia tanto *in vitro* como *in vivo*.

## PRODUCCIÓN DE LOS IFN RECOMBINANTES BOVINOS

Los miembros de la familia de los IFN-III, también conocidos como IFN- $\lambda$ , han sido identificados de manera reciente en varias especies incluyendo al hombre, ratón, cerdo y el bovino, especie de nuestro particular interés [111]. Basándonos en trabajos previos en los que identificaron y secuenciaron los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  bovinos, diseñamos la estrategia de clonado teniendo en cuenta la posterior expresión de estas proteínas en células de mamífero, ya que se trata de una proteína glicosilada [111], [115].

En este trabajo se han clonado las secuencias codificantes para los interferones tipo I (IFN- $\alpha$ ) y tipo III (IFN- $\lambda$ ) bovinos en los vectores de expresión eucariota: pCDNA4/HisMaxA y pCDNA3 (Invitrogen®), respectivamente. Como se describe en la sección de “Resultados” en un primer momento el clonado de ambos tipos de IFNs se realizó en el vector que contiene la “etiqueta” de histidinas (His-tag) para unificar los procedimientos y trabajar con un único vector. El IFN- $\lambda$  expresado desde pCDNA4/HisMaxA no tenía efecto antiviral y según la bibliografía [10] esto se había observado anteriormente en algunos casos en los que la “His-tag” se encontraba río arriba del ORF. Para evitar la pérdida de actividad, subclonamos el ORF para el IFN- $\lambda$  en el vector pCDNA3. El IFN- $\lambda$  expresado desde este vector mostró la actividad biológica esperada.

Para expresar los IFNr mediante transfecciones transitorias se evaluaron diferentes reactivos, tiempos de incubación y concentraciones de ADN hasta establecer el protocolo más adecuado para la producción de ambos IFNr en sobrenadantes de cultivo celular. El protocolo de transfección con polyfect (Qiagen®) fue el que arrojó mejores resultados en cuanto a la expresión de IFNr solubles. El protocolo del fabricante sugiere la cosecha de sobrenadantes de transfección a las 48 hs. De todos modos, evaluamos también el rendimiento del proceso modificando el tiempo de recolección de sobrenadantes a las 24

Después de la post-transfección, a fin de agilizar los tiempos del procedimiento. Se comprobó por medio de la cuantificación del IFN $\gamma$  producido con CAT ELISA que la cosecha a las 48 hs genera un mayor rendimiento de IFN $\gamma$ . Los IFN son acumulados en vesículas intracelulares antes de la secreción, y estas se generan de forma “simultánea” y son secretadas de manera explosiva por la célula [168], [169]. La secreción de los IFNs tiene lugar de esta manera ya que son citoquinas del sistema inmune innato y por lo tanto se sintetizan en conjunto frente al estímulo que presenta sobre todo una invasión viral [170].

La producción de los IFN $\gamma$  en este sistema es simple y permite obtener un producto concentrado directamente en el sobrenadante de las células transfectadas. Por lo tanto, la simple recolección del sobrenadante completa el proceso de obtención del IFN para poder ser aplicado ya sea sobre las células o inoculado por vía subcutánea en animales. Una vez puesto a punto el protocolo de expresión de los IFN $\gamma$  y habiéndose detectado los polipéptidos del tamaño esperado en Western Blot, se determinó el rendimiento de producción. La cuantificación se realizó mediante la titulación en el modelo VSV-MDBK [136] y también mediante MDBK-T2 (sistema reportero-CAT) expresándose en U/ml. La actividad sobre MDBK-T2 permite evaluar la actividad de los IFN $\gamma$  sobre el promotor MX, lo que constituye una medida directa de su actividad biológica [121], [122]. La cuantificación por ambos métodos arrojó valores similares. El rendimiento obtenido, alrededor de 40 U/ml, no es óptimo comparado con cultivos en alta densidad expresando por ejemplo, IFN- $\gamma$  en células de mamíferos, que están en el orden de  $10^5$  U/ml [171], pero para la escala de este trabajo fue suficiente. De todos modos, en nuestro laboratorio se está seleccionando la línea celular que exprese establemente el IFN- $\lambda$ . Al generar la línea celular transfectada de modo estable se seleccionará aquel clon que tenga mayor rendimiento de IFN- $\lambda$  soluble.

La expresión de IFN $\gamma$  utilizando el vector de expresión eucariota y transfecciones de células HEK293T no fue el único sistema de producción que evaluamos. Se logró expresar IFN- $\lambda$  utilizando baculovirus recombinante-células de insecto. El sistema se ajustó y el IFN expresado resultó tener actividad biológica. Se obtuvo un rendimiento similar al medido para las células HEK293T, cuantificado por CAT ELISA (38 U/ml), Estos resultados alentadores constituyen un antecedente favorable para poder plantear la producción de los IFN $\gamma$  también con este sistema, que puede ser positivo a la hora de transferir este desarrollo a una empresa. Otros autores describieron la producción del IFN- $\lambda$  en bacterias, que resultó ser biológicamente activo a pesar de no estar glicosilado. Nosotros clonamos el ORF para IFN- $\lambda$  en pET y expresamos los IFN $\gamma$  en BL21, pero no logramos un producto soluble con actividad biológica en este sistema (no se muestra). Recientemente Barathiraja y col [172] describieron la expresión y purificación del IFN- $\lambda$  bovino en *Pichia pastoris* que resultó ser biológicamente activo, a pesar de las diferencias en la glicosilación en este sistema respecto a las células de mamíferos. En este trabajo no se informan los rendimientos de producción. Estos resultados indican en conjunto, que el IFN- $\lambda$  es versátil en cuanto al soporte de producción y que sería factible el escalado.

Se evaluó la actividad biológica de los IFN $\gamma$  producidos en células HEK293T en el modelo de infección VFA O1-Campos en células de RFB. Este cultivo primario fue seleccionado luego de haber intentado trabajar con la línea celular BHK21, para la cual los IFN bovinos fueron tóxicos. Suponemos que esto puede deberse a que esta línea tiene su origen en la especie Hamster. No se hace referencia a esta desventaja en otros trabajos publicados.

Algunos autores informan la expresión por transfección transitoria de IFN- $\lambda$ 1 y 2 humano en células BHK21 [173], [174]. Sin embargo, no demostraron si los IFN producidos eran tóxicos sobre estas células.

Habitualmente se valora la actividad de los IFN mediante el tratamiento de las células antes de la infección [111], de todos modos y para asegurarnos que las mediciones realizadas revelaban el máximo de la actividad de nuestros IFNr, realizamos un ensayo de adición de IFN en las distintas etapas de la infección viral utilizando la cepa CP VDVB-Singer. Comprobamos que el mejor momento de adición de IFNr durante el ciclo de infección viral es realizar un tratamiento antes de la infección. Esto se debería a que el IFN genera un estado antiviral en el microambiente celular que evita el establecimiento de una infección o bien promueve una reducción de la misma [175]. A partir de este ensayo se pudo observar que los IFNr no tienen actividad virucida. La actividad virucida es la capacidad de un compuesto de inactivar directamente las partículas virales. De hecho, cuando el IFN se agrega en simultáneo con el virus, se observa infección. Pudimos verificar además que el IFN tiene actividad antiviral cuando se adiciona al cultivo después de iniciada la infección. Esto también coincide con la actividad inmunomoduladora y antiviral que presentan tanto los IFN de tipo I como los de tipo III [93], [111], [147]. Los IFN-I y III median diferentes mecanismos que contribuyen a la eliminación viral.

En el estudio de compuestos antivirales se utiliza la determinación del “Índice de Selectividad” (IS) a partir de un ensayo de citotoxicidad en el que se determina la concentración citotóxica 50% (CC50). A partir de los ensayos de actividad antiviral se calcula la concentración efectiva media (CE50) a partir del porcentaje de supervivencia contra las diferentes concentraciones del antiviral. El IS se calcula como el cociente entre los valores de CC50 y CE50 obtenidos en los ensayos anteriores. Uno de los criterios más usados para considerar la efectividad de un antiviral, es la obtención de un valor de índice de selectividad, por encima de 10. Cuanto mayor es el IS mayor es la actividad antiviral. Los valores de CC50 para los IFNr son muy bajos, de hecho, las preparaciones “puras” (sobrenadantes de transfección) no llegan a tener un 50% de toxicidad. Esto supone un excelente IS.

Hemos demostrado que la expresión de los ORF para IFN- $\lambda$  y  $\alpha$  bovinos en un sistema eucariota da lugar a productos solubles, secretados al ambiente extracelular, que tienen actividad biológica. La actividad biológica de los IFNr fue comprobada en ensayos de reducción de la infectividad de virus con sensibilidad conocida a estos IFN y en un sistema reportero que mide la capacidad de estas citoquinas de interactuar con el promotor Mx. Los ensayos realizados demostraron además actividad contra una cepa del VDVB. Sin embargo, y dado el gran número de variantes que presenta este virus era necesario evaluar la actividad de los IFNr producidos sobre cepas de diferente genotipo y biotipo.

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS IFN RECOMBINANTES SOBRE EL VDVB Y DESARROLLO DEL ELISA EN CÉLULAS

Previo a la evaluación de la actividad antiviral de cualquier compuesto se debe determinar si éstos afectan la viabilidad de las células a utilizar. El efecto de los IFNr producidos en nuestro laboratorio sobre la viabilidad de las células MDBK fue determinado en el capítulo 1 de esta tesis, ya sea midiendo la DO del cristal violeta utilizado para teñir células vivas o mediante la evaluación de actividad metabólica, estableciendo la capacidad reductora del XTT. Nuestros IFNr resultaron totalmente inocuos sobre las células MDBK, no se llegó a alcanzar siquiera una concentración citotóxica del 50%, incluso al medir viabilidad con la técnica metabólica que es muy sensible.

El paso siguiente fue determinar la capacidad antiviral de nuestros IFNr sobre distintas cepas del VDVB, para lo que precisábamos contar con una técnica simple y de alto rendimiento. Desarrollamos entonces el ELISA en células basado en la proteína no estructural NS3. El desarrollo de esta técnica constituyó en sí mismo un novedoso aporte para el análisis de la actividad antiviral midiendo la presencia de una proteína no estructural directamente sobre el cultivo celular sin necesidad de cosechar las células, aplicable a cualquier cepa viral que pueda crecer en cultivo más allá de que se vea afectada o no la viabilidad celular. Este ELISA en células produce un valor de DO que puede ser normalizado al número total de células en el pocillo, permitiendo comparaciones entre los distintos tratamientos en placas diferentes. Es una plataforma de alta eficiencia para evaluar la infectividad viral, simple de implementar y confiable, ya que los resultados obtenidos correlacionan con otros métodos utilizados actualmente para medir infección viral [132].

Los resultados obtenidos con el ELISA en células luego del tratamiento de las células MDBK con los IFNs fueron en un principio comparados con las lecturas provenientes de los ensayos colorimétricos, titulación viral y RT-qPCR, utilizando cepas de referencia tanto CP como NCP. Los valores del ELISA en células correlacionaron con aquellos determinados por los otros métodos en uso, con una correlación positiva para la titulación y número de copias del genoma viral y una correlación negativa para el ensayo colorimétrico de viabilidad (virus CP), como era esperado. El coeficiente de correlación más bajo observado fue entre los resultados del ELISA en células y el de la titulación viral usando Reed-Müench, probablemente debido a la variabilidad intrínseca de este ensayo [176]. Estos resultados confirman que la CI50 computada por el ELISA en células es semejante a la estimada por los otros métodos tradicionalmente utilizados.

El ELISA en células fue eficiente en la estimación de la CI50 de dos compuestos con diferente actividad antiviral, TSC [117] y PTC12 [116], produciendo valores similares a los ya reportados anteriormente para ambos compuestos utilizando métodos colorimétricos. Estos resultados indicaron que el uso del ELISA en células no está restringido a los IFN. Sin embargo, dado que el ELISA en células se basa en la detección de NS3, determina la infectividad como replicación viral, por lo que es importante tener en cuenta que puede no ser apropiado para evaluar compuestos antivirales que comprometan pasos posteriores a la replicación viral, como por ejemplo el ensamblado viral y/o la brotación.

Las seis cepas del VDVB evaluadas (de diferente genotipo y biotipo) fueron susceptibles a ambos IFNs, sin ningún tipo de asociación evidente entre la susceptibilidad y el genotipo o biotipo viral. Es interesante destacar, sin embargo, que dos cepas NCP tipo 2 que difieren en su virulencia, 98-124 y NY93 [24], también difieren en la susceptibilidad al IFN- $\alpha$ , mientras que sus valores de CI50 para el IFN- $\lambda$  fueron similares. Es interesante notar que la cepa de alta virulencia es menos sensible que la cepa de baja virulencia al IFN- $\alpha$ , esto podría estar relacionado a algún mecanismo de evasión eficiente probablemente mediado por Npro y/o ERNS [177], sin embargo hacen falta más experimentos para comprobar esta hipótesis. La cepa VS253 (CP, tipo 2) fue la más sensible al tratamiento con ambos IFNs. Esta cepa fue incluso más sensible que la cepa NADL (CP, tipo 1) al PTC12, otro compuesto antiviral [116]. La cepa VS253 es antigénicamente diferente a por lo menos 12 cepas entre las cuales hay de referencia y aislados locales y de otros países [126]. Esta diferencia antigénica podría ser relevante para esta particular sensibilidad a los antivirales.

El IFN- $\lambda$  se comporta a menudo como un antiviral más potente *in vivo* que *in vitro* [147]. Este efecto fue también descrito cuando se utilizó IFN- $\lambda$ 3 en la prevención de VFA en bovinos [65]. Nuestros resultados indican que, contra el VDVB, el efecto del IFN- $\lambda$  es comparable al del IFN- $\alpha$ , apoyando el uso de IFN- $\lambda$ r bovino, en lugar del IFN- $\alpha$ , para la prevención y/o tratamiento de la infección con VDVB.

El ELISA en células utiliza un anticuerpo contra una proteína no estructural del virus que se encuentra altamente conservada, permitiendo una detección directa de la replicación viral y pudiendo ser normalizado al número de células en el pocillo. Esta plataforma podría ser utilizada con cualquier cepa viral que pueda crecer en cultivos celulares, más allá de su efecto en la viabilidad celular y pudiéndose extender a otras aplicaciones que requieran una adecuada determinación de la infectividad viral. Como mide la infectividad viral, este ensayo puede también ser utilizado para la estimación del número de partículas infectivas en una muestra. El ELISA en células fue más sensible para cepas NCP que para CP ya que la infección con las CP es necesario detenerla antes de que se desarrolle el efecto citopático. La alta sensibilidad para la detección de virus NCP lo hace un método válido para el control biológico de productos como el suero fetal bovino, líneas celulares, etc., ya que el VDVB es considerado un agente adventicio.

Nuestros datos aportan al conocimiento de la actividad de los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  frente a diferentes cepas del VDVB *in vitro*, tanto sobre cepas de referencia como aislamientos locales. No existe en la bibliografía información sobre el uso del IFN- $\lambda$  como antiviral contra el VDVB. Entonces, para establecer una prueba de principios, evaluamos la actividad del IFN- $\lambda$  y contra el VDVB en un modelo murino.

## EVALUACIÓN DE LOS IFN RECOMBINANTES CONTRA EL VDVB EN UN MODELO MURINO

### ESTABLECIMIENTO DEL MODELO RATÓN DE INFECCIÓN POR EL VDVB

En este trabajo demostramos que dos cepas NCP del genotipo 2, una de alta virulencia (NY-93) y un aislamiento local de baja virulencia (98-124) son capaces de infectar ratones



BALB/c y de producir una viremia sostenida sin el desarrollo de signos clínicos y sin evidencias contundentes de afectación orgánica.

Seong y colaboradores, quienes por primera vez en 2015 [145] presentaron el modelo que hemos puesto a punto en nuestro laboratorio, no realizaron una curva de viremia como la presentada en este estudio. Ellos detectaron genoma viral en sangre de forma esporádica y no en todos los animales, incluso con resultados variables según la cepa infectante. La infección intranasal resultó en una viremia ocasional en algunos animales mientras que la aplicación IP fue más consistente. Nuestro estudio muestra que todos los animales que recibieron virus por vía IP, independientemente de la cepa utilizada, desarrollaron viremia y que la cinética no varió entre animales. Nuestro modelo es consistente en cuanto a las curvas de viremia que permiten un análisis adecuado de los tratamientos ulteriores, considerando este parámetro. Tanto nuestros resultados como los del grupo coreano evidencian la necesidad de caracterizar cada cepa particular ya que el comportamiento de las mismas puede ser sumamente variable.

En este trabajo, nosotros encontramos que únicamente la cepa de baja virulencia de tipo 2, considera una cepa “típica” en cuanto a su inmunopatogenia [21], induce una respuesta pro-inflamatoria sistémica en los ratones infectados, pero no la de alta virulencia. Seong y col. [145] observaron que dos cepas NCP del VDBV del genotipo 1 y 2 desarrollaron diferencias en la respuesta inmune innata, con un efecto regulatorio negativo para la cepa de tipo 2, comparada con la de tipo 1. También encontraron que la cepa NCP del VDVB-2 indujo la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Probablemente la cepa utilizada por Seong y col. se suscriba dentro de las cepas típicas de este genotipo. De hecho, a nivel del genoma, esta cepa presenta un 88% de homología con la cepa 98-124 y solamente un 77% con NY-93.

Seong y col. [145] detectaron al virus en el bazo y nódulos linfáticos mesentéricos en cuatro de los 6 ratones infectados, y solamente un animal infectado con una cepa NCP presentó virus en las células epiteliales del pulmón. Nuestros esfuerzos por localizar al VDVB en los diferentes tejidos del ratón fueron infructuosos. El grupo de Seong logró detectar antígenos del VDVB en tejidos mediante inmuno-histoquímica, una técnica mucho menos sensible que el RT-nested PCR utilizado en este trabajo. A nuestro entender es probable que no hayamos tomado las muestras al momento adecuado, ya que si bien nos guiamos con el trabajo de Seong y col., existen diferencias entre las diferentes cepas.

No pudimos confirmar la presencia de lesiones histopatológicas asociadas al VDVB en los órganos estudiados. Si bien en algunos animales se observaron cambios histopatológicos en bazo, los patólogos que analizaron los cortes histológicos no fueron concluyentes en cuanto a una asociación directa entre dichos cambios y la infección. Trabajos más antiguos demostraron que la infección de animales no-artiodáctilos con pestivirus produce cambios histopatológicos. Bachofen y col. demostraron que después de la exposición de conejos al VDVB [178], se produjeron cambios histológicos en órganos linfoides, que además resultaron positivos al virus por RT-PCR. Sin embargo, es muy probable que estos cambios existan y no fueron detectados por el tiempo en que se realizó la ablación de los órganos. Además del tiempo de ablación otro factor que pudo haber influenciado los resultados obtenidos en este trabajo pudo ser diferencias en la virulencia y en el tropismo de las cepas utilizadas. En nuestro caso, usamos un stock de virus que fue eficiente en reproducir la

enfermedad en terneros [133]. Información obtenida en nuestro laboratorio indica que cepas adaptadas a cultivo son menos eficientes en infectar células inmunes bovinas *ex vivo*, por lo que es importante además tener en cuenta que preparados virales con diferente historia de pasajes en hospedadores naturales, células inmunes en cultivo primario o bien en líneas celulares pueden resultar en diferente inmunopatogenia en los no-artiodáctilos.

El hallazgo de nuestro trabajo fue que ambas cepas evaluadas desarrollaron viremia en todos los ratones infectados. La diferencia entre ambas cepas es el momento en el que se produce el pico de viremia, que se inicia a los 4 dpi para NY-93 y a los 2 dpi para 98-124. Probablemente la cepa NY-93 de alta virulencia infecta con una cinética más acelerada. En ambos casos, sin embargo, los valores de viremia en el pico máximo son similares. Este resultado es equivalente al descrito en el modelo bovino [133], donde la viremia se inicia antes para NY-93 que para 98-124 pero con valores similares de título viral en sangre. En los bovinos, la infección por la cepa de baja virulencia se resuelve en 3-4 días, y la de baja virulencia se mantiene en circulación hasta 10 días. Los ratones, sin embargo, fueron incapaces de resolver la viremia. De hecho, un punto sumamente relevante de nuestro trabajo ha sido determinar la capacidad del VDVB de persistir en los ratones hasta por lo menos 60 días post-infección. Se realizó eutanasia a los 60 dpi, sin poder detectarse virus en ningún órgano por RT nested PCR. Trabajos realizados en nuestro laboratorio muestran que el VDVB es capaz de infectar células dendríticas de ratón sin causar la muerte de estas células [179]. Es posible, entonces, que la persistencia viral sea sostenida por las células dendríticas. Se precisan más experimentos para probar esta hipótesis.

En conjunto, nuestros resultados indican que el virus podría persistir en los ratones y abre una nueva aplicación del modelo que nunca ha sido reportado y que habrá que explorar oportunamente. Este es el primer trabajo en caracterizar la infección de un animal no-artiodáctilo con una cepa argentina del VDVB, y el primero en comparar el efecto de la infección en ratones de dos cepas del genotipo 2 de diferente virulencia, bien caracterizadas tanto *in vitro* como *in vivo*, en bovinos.

### APLICACIÓN DEL MODELO RATÓN PARA EVALUAR LA FACTIBILIDAD DEL TRATAMIENTO ANTIVIRAL CON IFN- $\lambda$ CONTRA EL VDVB

Los interferones de tipo I se han utilizado ampliamente para el tratamiento de infecciones por el VHC, y las evaluaciones pre-clínicas siempre se realizaron en modelos murinos. Los IFN recombinantes de ratón han demostrado exhibir una potente actividad antiviral en modelos de infección con numerosos virus como el HSV-2, EHV, influenza, entre otros. Cuando Ank y col. [147] examinaron la actividad del IFN de tipo III *in vivo* frente a tres infecciones virales sistémicas diferentes, observaron que esta citoquina redujo el título viral de HSV-2, impidiendo totalmente la replicación del virus en la vagina excediendo la actividad antiviral del IFN- $\alpha$ . No obstante, contra otros virus como el EMCV y el LCMV, la actividad del IFN- $\lambda$  *in vivo* fue menor a la de los IFN tipo I [147]. Analizando por separado la capacidad antiviral de los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  sobre el VHC Marcello y col. [180] propusieron que un tratamiento combinado con ambos IFN podría lograr mejores resultados ya que la cinética de genes inducibles por IFN- $\alpha$  e IFN- $\lambda$  se complementan entre sí, lo que generaría una mejor respuesta antiviral. Estos antecedentes nos llevaron a evaluar por separado y en

forma combinada la actividad de ambos interferones. No existen en la bibliografía reportes sobre experimentos que evalúen el uso combinado de los IFN-I y III para la profilaxis y/o tratamiento terapéutico de las infecciones virales *in vivo*.

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento sostenido pre y post-infección con IFN- $\lambda$  o bien la aplicación profiláctica de IFN- $\lambda$  seguida del tratamiento con IFN- $\alpha$  constituyen las estrategias más efectivas para anular la replicación del VDVB en ratones, que se verifica además por la ausencia de TNF- $\alpha$  sistémico. Los datos obtenidos con células bovinas indican que el tratamiento con IFN- $\alpha$  pero no con IFN- $\lambda$  impediría la infección de células inmunes de sangre periférica *in vitro*, por lo que si el IFN- $\lambda$  es efectivo es porque probablemente esté bloqueando algún evento de replicación temprano que seguramente se esté dando en otros tipos celulares que sí posean receptores para este IFN. Por ejemplo, mientras que el MNoV se replica en células hematopoyéticas, se encontró que el IFN- $\lambda$  actúa sobre células no hematopoyéticas, lo que sugiere que el mecanismo de acción es indirecto, lo mismo que observamos nosotros para el VDVB. Se ha propuesto que existen mecanismos inmunitarios innatos conservados evolutivamente y gatillados por el IFN- $\lambda$ , quizás con especial importancia en la protección contra la infección en células epiteliales de las superficies mucosales (intestino o tracto respiratorio). Es poco probable pensar en la inducción de algún evento pro-inflamatorio o innato que promuevan la eliminación viral, como se ha visto para norovirus [148] sobre todo por la ausencia de citoquinas pro-inflamatorias, sin embargo no podemos descartar que exista algún mecanismo de la inmunidad innata que esté actuando en favor de la eliminación del virus y que no hemos medido.

La dosis de IFN $\alpha$  utilizada en este trabajo fue tomada de trabajos anteriores en los que se evaluaron estos mismos IFN $\alpha$  en ratones BALB/c [114], [147]–[149]. Debido a restricciones económicas, ya que usamos citoquinas comerciales, no pudimos realizar ensayos de dosis-respuesta. Es probable y no podemos descartarlo, que trabajar con dosis más altas hubiera resultado en una mayor actividad antiviral de los IFN $\alpha$ , particularmente con IFN- $\lambda$  ya que con IFN- $\alpha$  trabajamos con dosis superiores a las de muchos estudios publicados.

La dosis de 2  $\mu$ g utilizada en este trabajo es similar a la que aplicaron Klinkhammer y col. (3  $\mu$ g, sc) [181] para prevenir la infección en las vías aéreas con el virus de influenza y su transmisión. Estos autores aplicaron una sola dosis de IFN- $\lambda$  18 hs pre-infección, que es un diseño similar al que utilizamos en el primer experimento.

Song y col. [106] evaluaron la actividad antiviral de diferentes subtipos de IFN- $\alpha$  humano en ratones BALB/c infectados con Virus de Hepatitis B (VHB). Los animales fueron tratados con dosis diarias de 8000 U durante 10 días consecutivos. Si bien la dosis fue menor a la utilizada en nuestros experimentos, el tratamiento fue más prolongado.

Trabajos anteriores como el de Eisuke y col. [149] en los que utilizaron IFN- $\alpha$  como tratamiento en ratones infectados con HCV, reportan buenos resultados en cuanto a la actividad antiviral de este tipo de IFN. Las dosis utilizadas en este caso fueron de 1000 U/día durante 7 días por vía intramuscular. Estos valores de dosificación son menores a los que utilizamos en nuestro experimento (250000 U/dosis) pero fueron administrados de una manera más prolongada. Belloni y col [182] trabajaron con dosis similares a las utilizadas por nuestro grupo. Belloni evaluó la actividad antiviral del IFN- $\alpha$  frente a ratones infectados experimentalmente con VHB con inoculaciones diarias aplicadas durante 10 días. Es

interesante hacer hincapié nuevamente en la practicidad que tiene a futuro un protocolo de menor duración como con el que trabajó nuestro grupo.

Una publicación reciente de Xia y col. [183] reportó la utilización de dosis muy bajas de IFN- $\alpha$  murino (30-100 pmol/dosis, 2 inoculaciones por semana durante 3 semanas) en ratones infectados con VHB y cursando una hepatitis crónica. Estos IFN están “pasilados” (se les agrega un polipéptido compuesto de prolina, alanina y serina - PAS) lo que aumenta su vida media en plasma. Esta novedosa tecnología resulta atractiva si al cabo de estudios ulteriores es necesario aumentar la biodisponibilidad de los IFN $\alpha$ .

Para determinar si existían diferencias en la eficacia entre la terapia con IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  aplicada antes o después de la infección, evaluamos en un primer experimento el efecto de una sola dosis de cada IFN el día previo o posterior a la infección. Se encontró que el IFN- $\lambda$  era más efectivo que el IFN- $\alpha$  para limitar la viremia de los ratones infectados con el VDVB 98-124 cuando se lo aplicaba antes de la infección. Por el contrario, el IFN- $\alpha$  fue más eficaz aplicado post-infección. Es probable que esto se deba a la distribución de los receptores para los distintos IFNs. Los receptores para IFN- $\lambda$  se encuentran en los epitelios de las superficies mucosales [69], por lo que podría pensarse que sean más eficientes en evitar la entrada del virus o su internalización a partir de las superficies epiteliales. Por otro lado, el IFN- $\alpha$  que tiene receptores en un gran número de células [76] y tejidos, incluidas las células sanguíneas, podría proteger de la diseminación viral.

Nuestros resultados sugieren que el modelo ratón es útil para evaluar el potencial de los IFN contra el VDVB *in vivo*, medido como reducción de la viremia. Seong y col [145] sugirieron que podría existir un efecto de sinergización del efecto antiviral cuando se combinaron ambos subtipos de IFN. Para estudiar esta posibilidad, en un segundo experimento evaluamos un tratamiento intensificado con diferentes combinaciones de IFN- $\alpha$  y  $\lambda$ , aplicando dos dosis pre-y/o post infección. Se evaluó el efecto de cada tratamiento en la reducción de la viremia y en la producción sistémica de TNF- $\alpha$ . Todos los tratamientos ensayados lograron disminuir la viremia de forma significativa comparado con el control no tratado. La diferencia radicó en que, algunos tratamientos que involucraron el uso de IFNs pre y post-infección lograron reducir el virus en sangre a niveles indetectables, a tal punto que la viremia en estos grupos no se reactivó al nivel del control no tratado.

Se ha demostrado que la aplicación de IFN- $\alpha$  en ratones regula negativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  [93]. Los IFN-I (tanto  $\alpha$  como  $\beta$ ) también suprimen la producción de IFN- $\gamma$ . Estudios recientes también han encontrado que el IFN- $\beta$  aumenta la expresión del factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 y el receptor de factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 tipo II por las células mononucleares de sangre periférica [93]. Nosotros encontramos que no habría una respuesta directa al tratamiento con IFNs en la producción de TNF- $\alpha$  sino más bien asociamos la ausencia de esta citoquina a una menor replicación viral, ya que los niveles más bajos de TNF- $\alpha$  se encontraron en aquellos grupos que controlaron la viremia completamente.

La aplicación de IFN- $\lambda$  puede activar la inmunidad innata resolviendo la infección viral entérica persistente por Norovirus en ratones [184]. El establecimiento de la infección entérica persistente por ciertas cepas de MNoV se relacionó con la incapacidad de inducir respuestas de IFN- $\lambda$ . La eficacia de IFN- $\lambda$  en la prevención de la persistencia entérica no requirió inmunidad adaptativa. Estos hallazgos proporcionan una visión diferente del

sistema inmunológico porque en general se cree que se requiere el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa para la eliminación de la infección viral mediante la selección de antígenos específicos. En este contexto, y contando con el modelo de infección persistente en ratones, nuestro grupo se ha propuesto investigar en el futuro, la capacidad del IFN- $\lambda$  de controlar la infección persistente por el VDVB.

Es importante destacar que, aunque los IFN tipo I y tipo III comparten muchas características biológicas, muestran diferencias tanto en términos de regulación de la inmunidad. El trabajo futuro revelará el papel y el mecanismo de acción de esta novedosa clase de citoquinas en la capacidad de limitar las infecciones por el VDVB.

En conclusión, se demostró que el modelo de ratón BALB/c infectado con el VDVB cepa 98-124 constituye una herramienta útil para investigar los efectos de la terapia de combinación con IFNs *in vivo*. Los resultados obtenidos en este modelo demuestran la factibilidad de que el tratamiento con IFN- $\lambda$  dos días previos a la infección, combinado con un tratamiento posterior ya sea con el mismo IFN- $\lambda$  o con IFN- $\alpha$  permite controlar la viremia en infecciones con una cepa de campo del VDVB. Al analizar el mecanismo de los efectos de las combinaciones de tratamientos, se pueden encontrar métodos terapéuticos que sean efectivos e incluso extrapolar estos conocimientos a estudios destinados a tratar infecciones por otros pestivirus, incluso los de importancia en salud humana como el VHC.

## APLICACIÓN DEL IFN- $\lambda$ RECOMBINANTE EN BOVINOS

El modelo ratón de infección por el VDVB demostró que el uso de IFN- $\lambda$  pre y post-infección sería tan efectivo como la terapia combinada con IFN- $\alpha$ . Proyectando un uso futuro de los IFN $\lambda$  en el campo, resulta más práctico trabajar con un único producto, lo que facilitaría el trabajo de ampliación y abarataría los costos del tratamiento.

Nuestros resultados han demostrado que la administración de IFN- $\lambda$ r bovino antes de la infección con el VDVB impide la enfermedad clínica en terneros, medido por una variedad de parámetros clínicos previamente establecidos para esta cepa particular. Este estudio también indica que el IFN- $\lambda$ r bovino es eficaz como agente antiviral directo contra el VDVB con actividad en el tracto respiratorio superior, ya que los animales no solamente no presentaron los síntomas respiratorios típicos de la cepa 98-124 sino que además no eliminaron virus en las secreciones nasales. Por lo tanto, el tratamiento con IFN- $\lambda$ r sería eficaz en evitar la enfermedad clínica y la diseminación del virus.

Otro interferón bovino, el IFN tau (boIFN- $\tau$ ) fue evaluado contra el VDVB por vía subcutánea con dosis de  $10^5$  y  $10^6$  U/kg de peso. Los terneros fueron inyectados con boIFN- $\tau$  durante dos rondas de inyecciones diarias durante cinco días desde el día 0 al día 4 (la primera ronda) y del Día 7 al Día 11 (la segunda ronda) [109]. Nuestro esquema fue mucho más corto y no se aplicó más de una dosis por día, lo que demuestra que el IFN- $\lambda$  es efectivo a dosis 1000 veces menores que el IFN- $\tau$ , una ventaja importante a la hora de aplicarlo como antiviral comercial. Nuestros resultados son comparables en dosis con aquellos obtenidos en humanos en los que el tratamiento con interferón redujo los signos clínicos y la eliminación de otro virus respiratorio, el rinovirus [185].

Los IFN- $\alpha$  y  $\lambda$  han mostrado actividad *in vitro* e *in vivo* contra el virus de la fiebre aftosa, aunque en este caso los mismos fueron aplicados por vía oral. El IFN- $\alpha$  oral también fue

eficaz cuando se administra a bovinos expuestos a IBR [186]. En estos estudios, las dosis de IFN- $\alpha$  aplicadas fueron de 30 a 500 U por ternero, que son valores comparables con los de este trabajo. Si bien la vía oral es efectiva, es menos eficiente sobre todo al trabajar a campo [134]. Los métodos más efectivos de administración oral de IFN incluyen virus como vectores, como adenovirus humanos [111]. Esta estrategia, sin embargo, fue evaluada como poco práctica para nuestro entorno regional y complicada desde el punto de vista regulatorio, por todas las pruebas que se requerirían poder liberar un virus humano a campo.

La administración de IFN- $\lambda$ r bovino por vía sc en las condiciones descritas en este trabajo no produjo efectos adversos en los animales incluso en dosis superiores a las que se encontraron efectivas. No se midieron cambios ostensibles en la temperatura corporal ni se modificaron parámetros hematológicos ni hepáticos en ninguno de los animales analizados, ya sea infectados o no infectados. Esto revela que el uso de IFN- $\lambda$ r aplicado por vía parenteral es seguro para los bovinos. Esto es una ventaja del uso de este IFN en particular, tal como fuera planteado en la hipótesis de este trabajo. La aplicación sistémica no implica actividad sistémica, debido a la particular localización de los receptores para el IFN- $\lambda$ , lo que limita la toxicidad del mismo.

Otros investigadores, que utilizaron IFN- $\alpha$  o IFN- $\tau$  en bovinos o bien IFN- $\alpha$  en otras especies, han encontrado que el interferón puede inducir fiebre transitoria después de la primera administración. En otras especies el uso de IFN- $\alpha$  alteró los parámetros hematológicos e inmunológicos después de un tratamiento prolongado [76]. Nosotros administramos el IFN $\tau$  en un tratamiento corto, razón por la cual no podemos descartar que esta sea la causa de la ausencia de efectos adversos. De todos modos, ningún IFN ha mostrado tener efectos secundarios graves en bovinos, incluso cuando se administraron dosis altas; es posible que los bovinos puedan tolerar el interferón mucho mejor que otras especies.

Los animales tratados con IFN e infectados con el VDVB mostraron ausencia de signos clínicos y secreción viral nasal pero en algunos de ellos se midieron bajos niveles de virus en sangre, y uno de los 4 terneros tratados presentó virus en sangre y secreciones nasales, aunque no mostró signos clínicos. Si bien no se puede descartar que existen variaciones individuales o alguna condición que no determinamos que lleven a que un animal no responda como el resto a un mismo tratamiento, no podemos descartar estar muy cerca del valor "límite" de la dosis efectiva. Como no hemos podido evaluar la dosis efectiva 50 en bovinos, a futuro y en un segundo experimento con un mayor número de animales realizaremos una curva dosis-respuesta para obtener la dosis apropiada capaz de proteger a la totalidad de los animales tratados, aunque en una situación de campo siempre es esperable diferencias individuales. De todos modos, la ausencia de síntomas es alentadora e indica que la dosis que se utilizará finalmente cuando el producto alcance estado comercial no será muy diferente a la evaluada en este estudio.

Trabajos anteriores han demostrado que los interferones pueden tener múltiples efectos inmunomoduladores que funcionan de manera integrada con otros aspectos de los mecanismos de defensa específicos y no específicos [187]. Se ha descrito en otras especies, que el IFN- $\lambda$  ejerce su actividad anti-inflamatoria disminuyendo la producción de IL-1 $\beta$  por los neutrófilos [33]. En bovinos, otros autores han encontrado incrementada IL-10

y sus receptores en bovinos tratados con IFN- $\lambda$  [134]. Estos autores han propuesto que en los animales tratados habría menos inmunosupresión y que los leucocitos podrían responder más rápidamente para eliminar otros patógenos. Nuestros resultados concuerdan con estos trabajos que describen la capacidad del IFN- $\lambda$  para modular positivamente la expresión de IL-10 (32) y promover un estado anti-inflamatorio, en este caso demostrado por la disminución en la producción sistémica de TNF- $\alpha$  asociada a la infección por la cepa del VDVB utilizada [133].

Los datos presentados en este trabajo de tesis demuestran claramente la factibilidad de la terapia con IFN- $\lambda$ r bovino contra el VDVB. Se debe enfatizar que, bajo condiciones experimentales, el interferón impidió la enfermedad clínica y la presencia de virus en las secreciones nasales, lo que evitaría la transmisión. Según nuestros estudios actuales, el interferón debería administrarse antes de la exposición al virus y mantenerse por unos días luego de la misma. Aunque estos resultados solo han demostrado que el IFN- $\lambda$ r tiene efecto sobre la infección por el VDVB *in vivo*, es muy probable que otros virus respiratorios sean también susceptibles, por lo tanto, el interferón bovino puede tener un doble papel beneficioso en estas infecciones, es decir, antiviral e inmunomodulador.

La administración de IFN exógeno a poblaciones bovinas en riesgo ante un brote con virus cuyos efectos acarrear grandes pérdidas económicas, como el VDVB o VFA, representa una alternativa atractiva y económica a la inducción de IFN endógeno por medios químicos, biológicos o recombinantes. Según datos de otros estudios realizados en bovinos [134], los beneficios de la administración de IFN se producen dentro de las 8 horas y no en los días, como en el caso de los inductores virales. Esto implica una efectividad prácticamente inmediata. Los IFN recombinantes como hemos demostrado, pueden ser producidos en sistemas simples y ser utilizados tanto de sobrenadantes directos como en forma purificada. Este trabajo constituye la primera evidencia experimental de la actividad del IFN- $\lambda$  bovino contra el VDVB *in vivo*, siendo efectivo en impedir la enfermedad clínica en terneros infectados con una cepa local del genotipo 2 y biotipo no citopático. Hemos establecido un sistema de producción en células de mamífero, y actualmente estamos trabajando en el establecimiento de la línea transfectada de forma estable para proceder a licenciar esta tecnología a una empresa nacional para que este bioterapéutico recombinante pueda finalmente llegar al campo.

Las aplicaciones potenciales del IFN- $\lambda$ r bovino en el campo son numerosas. Pensando únicamente en el VDVB se puede utilizar para cerrar la ventana de vulnerabilidad hasta que las vacunas desarrollen inmunidad protectora, en las prácticas modernas de feedlot (por ejemplo, para tratar animales al ingreso), luego del destete, ante un caso de brote en el campo, para evitar infecciones congénitas durante la etapa de mayor vulnerabilidad, entre otras opciones. Además, dado que el efecto de los interferones no es exclusivo de un virus en particular, y que esta ubicuidad, sumado al efecto local en epitelio de las mucosas del IFN- $\lambda$ , amplían su espectro de uso. Por otro lado, los antivirales pueden colaborar con los esfuerzos en disminuir el uso de antibióticos, al mitigar infecciones virales que predisponen a infecciones bacterianas oportunistas. Para utilizar el IFN- $\lambda$ r con fines clínicos en animales, incluidas las terapias para enfermedades virales agudas o infecciones oportunistas, es necesario realizar más investigaciones para establecer qué otros patógenos son

susceptibles a los efectos del IFN- $\lambda$  y en qué medida puede esta citoquina modular el sistema inmunitario de los bovinos.



---

## CONCLUSIONES

- Obtuvimos un antiviral recombinante seguro y eficaz, el IFN- $\lambda$ r bovino expresado en un sistema de células de mamíferos. El IFN- $\lambda$ r producido se secreta al sobrenadante de cultivo, es biológicamente activo y presenta efecto antiviral sobre cepas de campo y de referencia del VDVB de diferente genotipo y biotipo *in vitro*.
- Desarrollamos un ELISA en células que constituye una novedosa herramienta para establecer la infectividad tanto de virus citopáticos como no-citopáticos.
- Hemos establecido el modelo ratón de viremia por el VDVB, de gran utilidad para los estudios con este virus *in vivo*.
- El IFN- $\lambda$ r bovino desarrollado es inocuo y seguro en bovinos y capaz de proteger a esta especie contra la enfermedad clínica causada por una cepa de campo del genotipo 2 y biotipo NCP (aislada durante un brote en la provincia de Buenos Aires).

**Hemos comprobado la factibilidad de la utilización del IFN- $\lambda$ 3 bovino recombinante como bioterapéutico en infecciones con el VDVB**

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] D. B. Smith *et al.*, "Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae," *J. Gen. Virol.*, vol. 98, no. 8, pp. 2106–2112, 2017.
- [2] P. OLAFSON, A. D. MacCALLUM, and F. H. FOX, "An apparently new transmissible disease of cattle.," *Cornell Vet.*, vol. 36, pp. 205–13, Jul. 1946.
- [3] K. M. LEE and J. H. GILLESPIE, "Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture.," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 18, no. 69, pp. 952–3, Oct. 1957.
- [4] J. H. Gillespie, J. A. Baker, and K. McEntee, *The Cornell veterinarian*. Published under the auspices of the Alumni Association and Society of Comparative Medicine, New York State Veterinary College, Cornell University, 1959.
- [5] M. F. Coria and A. W. McClurkin, "Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus.," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 172, no. 4, pp. 449–51, Feb. 1978.
- [6] M. KALE, S. YAVRU, A. ATA, M. KOCAM&Uuml;l;FT&Uuml;l;OGLU, O. YAPICI, and S. HASIRCIOGLU, "Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection in Relation to Fertility in Heifers," *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 73, no. 3, pp. 331–336, 2011.
- [7] C. A. Muñoz-Zanzi, M. C. Thurmond, and S. K. Hietala, "Effect of bovine viral diarrhea virus infection on fertility of dairy heifers," *Theriogenology*, vol. 61, no. 6, pp. 1085–1099, Apr. 2004.
- [8] S. R. Bolin and J. F. Ridpath, "Frequency of association of noncytopathic bovine viral diarrhea virus with bovine neutrophils and mononuclear leukocytes before and after treatment with trypsin.," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 51, no. 11, pp. 1847–51, Nov. 1990.
- [9] J. Seago, S. Goodbourn, and B. Charleston, "The classical swine fever virus Npro product is degraded by cellular proteasomes in a manner that does not require interaction with interferon regulatory factor 3," *J. Gen. Virol.*, vol. 91, no. 3, pp. 721–726, Mar. 2010.
- [10] Z. Chen *et al.*, "Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhea virus.," *Virology*, vol. 366, no. 2, pp. 277–92, Sep. 2007.
- [11] H. J. W. Duffell, J. S., "Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle," *Vet Rec*, pp. 117, 240, 1985.
- [12] L. Hilton *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.*, vol. 80, no. 23, pp. 11723–11732, 2006.
- [13] C. Pellerin, J. Van Den Hurk, J. Lecomte, and P. Tijssen, "Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhea Virus Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities," *Virology*, vol. 203, no. 2, pp. 260–268, Sep. 1994.
- [14] J. F. Ridpath, S. R. Bolin, and E. J. Dubovi, "Segregation of Bovine Viral Diarrhea

- Virus into Genotypes,” *Virology*, vol. 205, no. 1, pp. 66–74, Nov. 1994.
- [15] S. M. Goyal, J. F. Ridpath, and Wiley InterScience (Online service), *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management, and control*. Blackwell, 2005.
- [16] M. S. Collett, R. Larson, S. K. Belzer, and E. Retzel, “Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus.,” *Virology*, vol. 165, no. 1, pp. 200–8, Jul. 1988.
- [17] J. D. Neill, “Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus,” *Biologicals*, vol. 41, no. 1, pp. 2–7, 2013.
- [18] W. V Corapi, R. D. Elliott, T. W. French, D. G. Arthur, D. M. Bezek, and E. J. Dubovi, “Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus,” *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 196, no. 4, pp. 590–6, Feb. 1990.
- [19] E. L. Ramos, “Preclinical and clinical development of pegylated interferon-lambda 1 in chronic hepatitis C.,” *J. Interferon Cytokine Res.*, vol. 30, no. 8, pp. 591–5, Aug. 2010.
- [20] Y. Li and J. McNally, “Characterization of RNA synthesis and translation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV).,” *Virus Genes*, vol. 23, no. 2, pp. 149–55, 2001.
- [21] D. A. Malacari, A. Pécora, M. S. Pérez Aguirreburualde, N. P. Cardoso, A. C. Odeón, and A. V. Capozzo, “In Vitro and In Vivo Characterization of a Typical and a High Pathogenic Bovine Viral Diarrhoea Virus Type II Strains,” *Front. Vet. Sci.*, vol. 5, no. April, pp. 1–10, 2018.
- [22] K. Yeşilbağ, G. Alpay, and P. Becher, “Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus,” *Viruses*, vol. 9, no. 6, 2017.
- [23] E. F. Flores, J. F. Ridpath, R. Weiblen, F. S. . Vogel, and L. H. V. . Gil, “Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2,” *Virus Res.*, vol. 87, no. 1, pp. 51–60, Jul. 2002.
- [24] A. Pecora *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.*, vol. 36, no. 3, pp. 157–164, Sep. 2012.
- [25] S. Vilcek *et al.*, “Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups.,” *Arch. Virol.*, vol. 146, no. 1, pp. 99–115, 2001.
- [26] C. L. Kelling, “Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines,” *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, vol. 20, no. 1, pp. 115–129, Mar. 2004.
- [27] D. M. Bezek, Y. T. Gröhn, and E. J. Dubovi, “Effect of acute infection with noncytopathic or cytopathic bovine viral diarrhoea virus isolates on bovine platelets.,” *Am. J. Vet. Res.*, vol. 55, no. 8, pp. 1115–9, Aug. 1994.
- [28] A. Pecora and M. S. Pérez Aguirreburualde, “Actualización en diarrea viral bovina, herramientas diagnósticas y estrategias de prevención,” *INTA Ediciones*, 2017.
- [29] N. Cardoso *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.*, vol. 29, no. 7, pp. 417–429, Sep. 2016.
- [30] E. J. Glew, B. V. Carr, L. S. Brackenbury, J. C. Hope, B. Charleston, and C. J. Howard, “Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells,” *J. Gen. Virol.*, vol. 84, no. 7, pp. 1771–1780, Jul. 2003.
- [31] P. Sopp, L. B. Hooper, M. C. Clarke, C. J. Howard, and J. Brownlie, “Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes.,” *J. Gen. Virol.*, vol. 75 ( Pt 5), no. 5, pp. 1189–94, May 1994.
- [32] S.-R. Lee, G. T. Pharr, B. L. Boyd, and L. M. Pinchuk, “Bovine viral diarrhea viruses modulate toll-like receptors, cytokines and co-stimulatory molecules genes expression in bovine peripheral blood monocytes,” *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 31, no. 5, pp. 403–418, Sep. 2008.
- [33] K. Blazek *et al.*, “IFN- $\lambda$  resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1 $\beta$  production.,” *J. Exp. Med.*, vol. 212, no. 6, pp. 845–53, Jun. 2015.
- [34] K. Palucka and J. Banchereau, “How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 14, no. 4, pp. 420–431, Aug. 2002.
- [35] E. Reid *et al.*, “Type I and III IFNs Produced by Plasmacytoid Dendritic Cells in Response to a Member of the Flaviviridae Suppress Cellular Immune Responses.,” *J. Immunol.*, vol. 196, no. 10, pp. 4214–26, May 2016.
- [36] C. C. L. Chase, “The impact of BVDV infection on adaptive immunity,” *Biologicals*, vol. 41, no. 1, pp. 52–60, 2013.
- [37] M. Giangaspero, R. Harasawa, L. Weber, and A. Belloli, “Taxonomic and epidemiological aspects of the bovine viral diarrhoea virus 2 species through the observation of the secondary structures in the 5' genomic untranslated region,” *Vet Ital*, vol. 44, no. 2, pp. 319–345, 2008.
- [38] G. P. Grissett, B. J. White, and R. L. Larson, “Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex.,” *J. Vet. Intern. Med.*, vol. 29, no. 3, pp. 770–80, 2015.
- [39] A. Khodakaram-Tafti and G. H. Farjanikish, “Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds,” *Iran. J. Vet. Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 154–163, 2017.
- [40] R. W. Fulton *et al.*, “Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease.,” *Can. J. Vet. Res.*, vol. 66, no. 3, pp. 181–90, Jul. 2002.
- [41] S. R. Lanyon, F. I. Hill, M. P. Reichel, and J. Brownlie, “Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis,” *Vet. J.*, vol. 199, no. 2, pp. 201–209, Feb. 2014.
- [42] M. D. Givens *et al.*, “Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus,” *Vet. Microbiol.*, vol. 139, no. 1–2, pp. 42–51, Oct. 2009.
- [43] V. Moennig and B. Liess, “Pathogenesis of Intrauterine Infections With Bovine Viral Diarrhea Virus,” *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, vol. 11, no. 3, pp. 477–487, Nov. 1995.

- [44] B. W. Brodersen, "Bovine Viral Diarrhea Virus Infections: Manifestations of Infection and Recent Advances in Understanding Pathogenesis and Control," *Vet. Pathol.*, vol. 51, no. 2, pp. 453–464, 2014.
- [45] J. Brownlie, L. Hooper, I. Thompson, and M. Collins, "Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV)—the bovine pestivirus," *Clin. Diagn. Virol.*, vol. 10, no. 2–3, pp. 141–150, Jul. 1998.
- [46] B. Scharnböck *et al.*, "A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2018.
- [47] H. Houe, "Economic impact of BVDV infection in dairies," *Biologicals*, vol. 31, no. 2, pp. 137–143, Jun. 2003.
- [48] B. Thomann, A. Tschopp, I. Magouras, M. Meylan, G. Schüpbach-Regula, and B. Häslar, "Economic evaluation of the eradication program for bovine viral diarrhoea in the Swiss dairy sector," *Prev. Vet. Med.*, vol. 145, pp. 1–6, Sep. 2017.
- [49] F. S. y D. S. Carlos Pacifico, "Seminario de Sustentabilidad y Modernización en la Ganadería Bovina en Argentina - Rural Primicias." [Online]. Available: <http://ruralprimicias.com.ar/noticia-se-realizo-el-seminario-de-sustentabilidad-y-modernizacion-en-la-ganaderia-bovina-en-argentina--18460.php>. [Accessed: 17-Dec-2018].
- [50] L. R. Jones, R. Zandomeni, and E. L. Weber, "Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina," *Vet. Microbiol.*, vol. 81, no. 4, pp. 367–375, Aug. 2001.
- [51] A. C. Odeón *et al.*, "Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina," *Vet. Microbiol.*, vol. 96, no. 2, pp. 133–144, Oct. 2003.
- [52] O. Zabal, A. L. Kobrak, I. A. Lager, A. A. Schudel, and E. L. Weber, "[Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhoea virus].," *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 32, no. 1, pp. 27–32.
- [53] T. Sandvik, "Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes," *Prev. Vet. Med.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 3–16, Nov. 2005.
- [54] H. Voges, G. Horner, S. Rowe, and G. Wellenberg, "Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull," *Vet. Microbiol.*, vol. 61, no. 3, pp. 165–175, Mar. 1998.
- [55] C. J. Brusckhe, H. A. Paal, and K. Weerdmeester, "[Detection of bovine virus diarrhoea virus in a live bovine herpes virus 1 marker vaccine].," *Tijdschr. Diergeneesk.*, vol. 126, no. 6, pp. 189–90, Mar. 2001.
- [56] S. R. Bolin and J. F. Ridpath, "Prevalence of Bovine Viral Diarrhoea Virus Genotypes and Antibody against those Viral Genotypes in Fetal Bovine Serum," *J. Vet. Diagnostic Investig.*, vol. 10, no. 2, pp. 135–139, Apr. 1998.
- [57] M. D. Givens, A. M. Heath, K. V Brock, B. W. Brodersen, R. L. Carson, and D. A. Stringfellow, "Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 64, no. 4, pp. 428–34, Apr. 2003.

- [58] L. H. V. G. Gil *et al.*, “The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism.,” *J. Virol.*, vol. 80, no. 2, pp. 900–11, Jan. 2006.
- [59] V. Palfi, H. Houe, and J. Philipsen, “Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves.,” *Acta Vet. Scand.*, vol. 34, no. 1, pp. 105–7, 1993.
- [60] T. S. Work and E. Work, “Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Volume 1.,” *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol. Vol. 1.*, 1969.
- [61] B. W. Newcomer, P. H. Walz, M. D. Givens, and A. E. Wilson, “Efficacy of bovine viral diarrhea virus vaccination to prevent reproductive disease: A meta-analysis,” *Theriogenology*, vol. 83, no. 3, pp. 360–365, 2015.
- [62] B. W. Newcomer *et al.*, “Effect of treatment with a cationic antiviral compound on acute infection with bovine viral diarrhea virus.,” *Can. J. Vet. Res.*, vol. 77, no. 3, pp. 170–6, 2013.
- [63] B. W. Newcomer, P. H. Walz, and M. D. Givens, “Potential applications for antiviral therapy and prophylaxis in bovine medicine,” *Anim. Heal. Res. Rev.*, vol. 15, no. 1, pp. 102–117, 2014.
- [64] A. ISAACS and J. LINDENMANN, “Virus interference. I. The interferon.,” *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.*, vol. 147, no. 927, pp. 258–67, Sep. 1957.
- [65] S. Perez-Martin *et al.*, “Cellular Immune Responses Suppress Flaviviridae Member of the a Plasmacytoid Dendritic Cells in Response to Type I and III IFNs Produced by,” *J Immunol Ref.*, vol. 196, pp. 4214–4226, 2016.
- [66] D. Kugel, J. E. Pulverer, M. Köster, H. Hauser, and P. Staeheli, “Novel Nonviral Bioassays for Mouse Type I and Type III Interferon,” *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 345–349, Apr. 2011.
- [67] S. Pestka, C. D. Krause, and M. R. Walter, “Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors,” *Immunol. Rev.*, vol. 202, no. 1, pp. 8–32, Dec. 2004.
- [68] R. P. Donnelly and S. V. Kotenko, “Interferon-lambda: a new addition to an old family.,” *J. Interferon Cytokine Res.*, vol. 30, no. 8, pp. 555–64, Aug. 2010.
- [69] K. LOPUŠNÁ *et al.*, “Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity,” *Acta Virol.*, vol. 57, no. 02, pp. 171–179, 2013.
- [70] J. M. González-Navajas, J. Lee, M. David, and E. Raz, “Immunomodulatory functions of type I interferons,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 2, pp. 125–135, 2012.
- [71] E. Reid and B. Charleston, “Type I and III Interferon Production in Response to RNA Viruses,” *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 34, no. 9, pp. 649–658, 2014.
- [72] F. McNab, K. Mayer-Barber, A. Sher, A. Wack, and A. O’Garra, “Type I interferons in infectious disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 2, pp. 87–103, 2015.
- [73] T. Mahlaköiv, P. Hernandez, K. Gronke, A. Diefenbach, and P. Staeheli, “Leukocyte-Derived IFN- $\alpha/\beta$  and Epithelial IFN- $\lambda$  Constitute a Compartmentalized Mucosal

- Defense System that Restricts Enteric Virus Infections,” *PLOS Pathog.*, vol. 11, no. 4, p. e1004782, Apr. 2015.
- [74] S. V. Kotenko and J. E. Durbin, “Contribution of type III interferons to antiviral immunity: Location, location, location,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 18, pp. 7295–7303, 2017.
- [75] F. ching Lin and H. A. Young, “Interferons: Success in anti-viral immunotherapy,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 369–376, 2014.
- [76] G. Trinchieri, “Type I interferon: friend or foe?,” *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 10, pp. 2053–2063, 2010.
- [77] T. Peng, J. Zhu, Y. Hwangbo, L. Corey, and R. E. Bumgarner, “Independent and cooperative antiviral actions of beta interferon and gamma interferon against herpes simplex virus replication in primary human fibroblasts.,” *J. Virol.*, vol. 82, no. 4, pp. 1934–45, Feb. 2008.
- [78] K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, “Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 75, no. 2, pp. 163–189, Feb. 2004.
- [79] P. Sheppard *et al.*, “IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R,” *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 63–68, Jan. 2003.
- [80] S. V. Kotenko *et al.*, “IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex,” *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 69–77, Jan. 2003.
- [81] D. Ge *et al.*, “Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance,” *Nature*, vol. 461, no. 7262, pp. 399–401, Sep. 2009.
- [82] V. Suppiah *et al.*, “IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy,” *Nat. Genet.*, vol. 41, no. 10, pp. 1100–1104, Oct. 2009.
- [83] Y. Tanaka *et al.*, “Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for chronic hepatitis C,” *Nat. Genet.*, vol. 41, no. 10, pp. 1105–1109, Oct. 2009.
- [84] C. Dellgren, H. H. Gad, O. J. Hamming, J. Melchjorsen, and R. Hartmann, “Human interferon- $\lambda$ 3 is a potent member of the type III interferon family,” *Genes Immun.*, vol. 10, no. 2, pp. 125–131, 2009.
- [85] E. M. Coccia *et al.*, “Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and  $\lambda$  interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, no. 3, pp. 796–805, 2004.
- [86] C. Sommereyns, S. Paul, P. Staeheli, and T. Michiels, “IFN-lambda (IFN- $\lambda$ ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo,” *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 3, pp. 1–12, 2008.
- [87] O. J. Hamming, H. H. Gad, S. Paludan, and R. Hartmann, “Lambda Interferons: New Cytokines with Old Functions.,” *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 3, no. 4, pp. 795–809, Mar. 2010.

- [88] K. Witte *et al.*, “Despite IFN- $\lambda$  receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines,” *Genes Immun.*, vol. 10, no. 8, pp. 702–714, Dec. 2009.
- [89] E. C. Borden *et al.*, “Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 12, pp. 975–990, Dec. 2007.
- [90] A. Aghemo, M. G. Rumi, and M. Colombo, “Pegylated interferons  $\alpha$ 2a and  $\alpha$ 2b in the treatment of chronic hepatitis C,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 7, no. 9, pp. 485–494, Sep. 2010.
- [91] I. E. Galani *et al.*, “Interferon- $\lambda$  Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness.,” *Immunity*, vol. 46, no. 5, p. 875–890.e6, May 2017.
- [92] A. Broggi, Y. Tan, F. Granucci, and I. Zanoni, “IFN- $\lambda$  suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function.,” *Nat. Immunol.*, vol. 18, no. 10, pp. 1084–1093, Oct. 2017.
- [93] E. Andreakos, I. Zanoni, and I. E. Galani, “Lambda interferons come to light: dual function cytokines mediating antiviral immunity and damage control,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 56, pp. 67–75, Feb. 2019.
- [94] S. Davidson *et al.*, “IFN $\lambda$  is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFN $\alpha$  treatment.,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 8, no. 9, pp. 1099–112, 2016.
- [95] M. T. Chiriac *et al.*, “Activation of Epithelial Signal Transducer and Activator of Transcription 1 by Interleukin 28 Controls Mucosal Healing in Mice With Colitis and Is Increased in Mucosa of Patients With Inflammatory Bowel Disease.,” *Gastroenterology*, vol. 153, no. 1, p. 123–138.e8, Jul. 2017.
- [96] A. Chrysanthopoulou *et al.*, “Interferon lambda1/IL-29 and inorganic polyphosphate are novel regulators of neutrophil-driven thromboinflammation,” *J. Pathol.*, vol. 243, no. 1, pp. 111–122, Sep. 2017.
- [97] F. J. D. Mennechet and G. Uzé, “Interferon-lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells.,” *Blood*, vol. 107, no. 11, pp. 4417–23, Jun. 2006.
- [98] A. Dolganiuc *et al.*, “Type III Interferons, IL-28 and IL-29, Are Increased in Chronic HCV Infection and Induce Myeloid Dendritic Cell-Mediated FoxP3+ Regulatory T Cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, pp. 1–10, 2012.
- [99] O. Koltsida *et al.*, “IL-28A (IFN- $\lambda$ 2) modulates lung DC function to promote Th1 immune skewing and suppress allergic airway disease.,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 3, no. 6, pp. 348–61, Jun. 2011.
- [100] A. HOOKER and D. JAMES, “**Review**: The Glycosylation Heterogeneity of Recombinant Human IFN- $\gamma$ ,” *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 287–295, May 1998.
- [101] J. N. M. Ijzermans and R. L. Marquet, “Interferon-gamma: A Review,” *Immunobiology*,



- vol. 179, no. 4–5, pp. 456–473, Oct. 1989.
- [102] A. Billiau, H. Heremans, F. Vandekerckhove, and C. Dillen, “Anti-interferon-gamma antibody protects mice against the generalized Shwartzman reaction.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 17, no. 12, pp. 1851–4, Dec. 1987.
- [103] A. M. Targovnik *et al.*, “Expression and purification of recombinant feline interferon in the baculovirus-insect larvae system,” *Process Biochem.*, vol. 49, no. 6, pp. 917–926, Jun. 2014.
- [104] Y. Tu *et al.*, “Extracellular expression and antiviral activity of a bovine interferon-alpha through codon optimization in *Pichia pastoris*,” *Microbiol. Res.*, vol. 191, pp. 12–18, Oct. 2016.
- [105] E. Baron and S. Narula, “From Cloning to a Commercial Realization: Human Alpha Interferon,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 10, no. 3, pp. 179–190, Jan. 1990.
- [106] J. Song *et al.*, “Different antiviral effects of IFN $\alpha$  subtypes in a mouse model of HBV infection,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017.
- [107] H. Bagis *et al.*, “Expression of Biologically Active Human Interferon Gamma in the Milk of Transgenic Mice Under the Control of the Murine Whey Acidic Protein Gene Promoter,” *Biochem. Genet.*, vol. 49, no. 3–4, pp. 251–257, Apr. 2011.
- [108] A. Razaghi, L. Owens, and K. Heimann, “Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation,” *J. Biotechnol.*, vol. 240, pp. 48–60, Dec. 2016.
- [109] J. Kohara, Y. Nishikura, S. Konnai, M. Tajima, and M. Onuma, “Effects of interferon-tau on cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus.,” *Jpn. J. Vet. Res.*, vol. 60, no. 2–3, pp. 63–70, 2012.
- [110] W. Huang *et al.*, “Interferon- $\gamma$  responses to *Mycobacterium tuberculosis* Rpf proteins in contact investigation,” *Tuberculosis*, vol. 93, no. 6, pp. 612–617, Nov. 2013.
- [111] F. Díaz-San Segundo *et al.*, “Antiviral activity of bovine type III interferon against foot-and-mouth disease virus,” *Virology*, vol. 413, no. 2, pp. 283–292, 2011.
- [112] S. F. Peek, M. D. Bonds, P. Schaele, S. Weber, K. Friedrichs, and R. D. Schultz, “Evaluation of antiviral activity and toxicity of recombinant human interferon alfa-2a in calves persistently infected with type 1 bovine viral diarrhea virus,” *Am. J. Vet. Res.*, vol. 65, no. 6, pp. 865–870, 2004.
- [113] I. Gresser, M. T. Bandu, D. Brouty-boyé, and M. Tovey, “Pronounced antiviral activity of human interferon on bovine and porcine cells.,” *Nature*, vol. 251, no. 5475, pp. 543–5, Oct. 1974.
- [114] H. Sentsui, R. Takami, T. Nishimori, K. Murakami, T. Yokoyama, and Y. Yokomizo, “Anti-viral effect of interferon-alpha on bovine viral diarrhea virus.,” *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 60, no. 12, pp. 1329–33, 1998.
- [115] E. Perez-Martin *et al.*, “Bovine Type III Interferon Significantly Delays and Reduces the Severity of Foot-and-Mouth Disease in Cattle,” *J. Virol.*, vol. 86, no. 8, pp. 4477–4487, 2012.

- [116] M. J. Pascual *et al.*, "Structure-based drug design for envelope protein E2 uncovers a new class of bovine viral diarrhea inhibitors that block virus entry," *Antiviral Res.*, vol. 149, no. August 2017, pp. 179–190, 2018.
- [117] E. F. Castro *et al.*, "Inhibition of bovine viral diarrhea virus RNA synthesis by thiosemicarbazone derived from 5,6-dimethoxy-1-indanone.," *J. Virol.*, vol. 85, no. 11, pp. 5436–45, Jun. 2011.
- [118] M. Romero, M. Serrano, M. Vallejo, T. Efferth, M. Alvarez, and J. Marin, "Antiviral Effect of Artemisinin from *Artemisia annua* against a Model Member of the *Flaviviridae* Family, the Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV)," *Planta Med.*, vol. 72, no. 13, pp. 1169–1174, Oct. 2006.
- [119] B. W. Newcomer and M. D. Givens, "Approved and experimental countermeasures against pestiviral diseases: Bovine viral diarrhea, classical swine fever and border disease," *Antiviral Res.*, vol. 100, no. 1, pp. 133–150, Oct. 2013.
- [120] C. Tami *et al.*, "Evidence of the Coevolution of Antigenicity and Host Cell Tropism of Foot-and-Mouth Disease Virus In Vivo Evidence of the Coevolution of Antigenicity and Host Cell Tropism of Foot-and-Mouth Disease Virus In Vivo," *Journal Virol.*, vol. 77, no. 2, pp. 1219–1226, 2003.
- [121] C. François *et al.*, "Quantification of different human alpha interferon subtypes and pegylated interferon activities by measuring MxA promoter activation.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 9, pp. 3770–5, Sep. 2005.
- [122] M. D. Fray, G. . Mann, and B. Charleston, "Validation of an Mx/CAT reporter gene assay for the quantification of bovine type-I interferon," *J. Immunol. Methods*, vol. 249, no. 1–2, pp. 235–244, Mar. 2001.
- [123] O. L. Franco Mahecha *et al.*, "Single dilution Avidity-Blocking ELISA as an alternative to the Bovine Viral Diarrhea Virus neutralization test," *J. Virol. Methods*, vol. 175, no. 2, pp. 228–235, Aug. 2011.
- [124] A. C. Odeón, M. R. Leunda, C. Faverín, N. Boynak, M. M. Vena, and O. Zabal, "In vitro amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: effect of cell line and culture conditions.," *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 41, no. 2, pp. 79–85, 2009.
- [125] A. C. Odeón, C. L. Kelling, D. J. Marshall, E. S. Estela, E. J. Dubovi, and R. O. Donis, "Experimental Infection of Calves with Bovine Viral Diarrhea Virus Genotype II (NY-93)," *J. Vet. Diagnostic Investig.*, vol. 11, no. 3, pp. 221–228, May 1999.
- [126] A. Pecora *et al.*, "First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina," *Res. Vet. Sci.*, vol. 96, no. 1, pp. 204–212, Feb. 2014.
- [127] D. Bucafusco *et al.*, "Influence of antibodies transferred by colostrum in the immune responses of calves to current foot-and-mouth disease vaccines," *Vaccine*, vol. 32, no. 48, pp. 6576–6582, Nov. 2014.
- [128] A. V. Capozzo *et al.*, "Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein G carrying a tandem dimer of Foot and Mouth Disease Virus antigenic site A can be used as DNA and peptide vaccine for cattle," *Antiviral Res.*, vol. 92, no. 2, pp. 219–227, Nov. 2011.
- [129] T. L. Robinson, I. A. Sutherland, and J. Sutherland, "Validation of candidate bovine

- reference genes for use with real-time PCR," *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 115, no. 1–2, pp. 160–165, Jan. 2007.
- [130] S. Vilcek, "[Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and pestiviruses].," *Vet. Med. (Praha)*, vol. 39, no. 11, pp. 687–700, 1994.
- [131] L. J. REED and H. MUENCH, "A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS<sup>12</sup>," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 27, no. 3, pp. 493–497, May 1938.
- [132] M. E. Quintana *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*, vol. 260, pp. 75–81, 2018.
- [133] D. a. Malacari, "Desarrollo de un modelo de infección para el Virus de la Diarrea Viral Bovina en terneros privados de calostro para su aplicación en la evaluación de vacunas y estudios inmunopatológicos .," p. 200, 2014.
- [134] S. W. Mamber *et al.*, "Low-dose oral interferon modulates expression of inflammatory and autoimmune genes in cattle," *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 172, pp. 64–71, Apr. 2016.
- [135] W. P. Michalski, B. J. Shiell, T. E. O'Neil, G. Beddome, and J. W. Lowenthal, "Recombinant Chicken IFN-gamma Expressed in Escherichia coli: Analysis of C-Terminal Truncation and Effect on Biologic Activity," *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 383–392, Apr. 1999.
- [136] J. A. Green, G. J. Stanton, J. Goode, and S. Baron, "Vesicular stomatitis virus plaque production in monolayer cultures with liquid overlay medium: description and adaptation to a one-day, human interferon-plaque.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 4, no. 6, pp. 479–85, Dec. 1976.
- [137] M. A. Horisberger, G. K. McMaster, H. Zeller, M. G. Wathelet, J. Dellis, and J. Content, "Cloning and sequence analyses of cDNAs for interferon- and virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: functional study of the corresponding gene promoter.," *J. Virol.*, vol. 64, no. 3, pp. 1171–81, Mar. 1990.
- [138] A. Asano, H. K. Jin, and T. Watanabe, "Mouse Mx2 gene: organization, mRNA expression and the role of the interferon-response promoter in its regulation," *Gene*, vol. 306, pp. 105–113, Mar. 2003.
- [139] B. Collet and C. J. Secombes, "The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter. Structural and functional characterization.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 268, no. 6, pp. 1577–84, Mar. 2001.
- [140] A. Meager, "Biological assays for interferons," *J. Immunol. Methods*, vol. 261, no. 1–2, pp. 21–36, Mar. 2002.
- [141] M. Yi, "Hepatitis C virus: propagation, quantification, and storage.," *Curr. Protoc. Microbiol.*, vol. Chapter 15, p. Unit 15D.1, Nov. 2010.
- [142] B. Gu *et al.*, "The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication.," *J. Virol.*, vol. 74,

- no. 4, pp. 1794–800, Feb. 2000.
- [143] L. M. Finkielstein *et al.*, “New 1-indanone thiosemicarbazone derivatives active against BVDV,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 8, pp. 1767–1773, Aug. 2008.
- [144] G. Seong, J.-S. Lee, K.-H. Lee, and K.-S. Choi, “Experimental infection with cytopathic bovine viral diarrhea virus in mice induces megakaryopoiesis in the spleen and bone marrow,” *Arch. Virol.*, vol. 161, no. 2, pp. 417–424, Feb. 2016.
- [145] G. Seong, J.-K. Oem, K.-H. Lee, and K.-S. Choi, “Experimental infection of mice with bovine viral diarrhea virus,” *Arch. Virol.*, vol. 160, no. 6, pp. 1565–1571, Jun. 2015.
- [146] G. Seong, J.-S. Lee, K.-H. Lee, S.-U. Shin, J. Y. Yoon, and K.-S. Choi, “Noncytopathic bovine viral diarrhea virus 2 impairs virus control in a mouse model,” *Arch. Virol.*, vol. 161, no. 2, pp. 395–403, Feb. 2016.
- [147] N. Ank, H. West, C. Bartholdy, K. Eriksson, A. R. Thomsen, and S. R. Paludan, “Lambda Interferon (IFN- $\lambda$ ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo,” *J. Virol.*, vol. 80, no. 9, pp. 4501–4509, 2006.
- [148] T. J. Nice *et al.*, “Interferon- $\lambda$  cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity,” *Science (80- )*, vol. 347, no. 6219, pp. 269–273, 2015.
- [149] E. Miyaki *et al.*, “Interferon alpha treatment stimulates interferon gamma expression in type I NKT cells and enhances their antiviral effect against hepatitis C virus,” *PLoS One*, vol. 12, no. 3, pp. 1–12, 2017.
- [150] D. A. Malacari, “XI CONGRESO ARGENTINO DE VIROLOGÍA 2015 II Congreso Latinoamericano de Virología hs. CONFERENCIA PLENARIA INAUGURAL.”
- [151] S. S. Diebold, “Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 7, pp. 813–823, Apr. 2008.
- [152] C. L. Baumann *et al.*, “CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9,” *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 12, pp. 2689–701, Nov. 2010.
- [153] S. N. Lester and K. Li, “Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity,” *J. Mol. Biol.*, vol. 426, no. 6, pp. 1246–1264, Mar. 2014.
- [154] S. Jensen and A. R. Thomsen, “Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion,” *J. Virol.*, vol. 86, no. 6, pp. 2900–10, Mar. 2012.
- [155] A. Sabbah *et al.*, “Activation of innate immune antiviral responses by Nod2,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 10, pp. 1073–1080, Oct. 2009.
- [156] S. D. Shapira *et al.*, “A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection,” *Cell*, vol. 139, no. 7, p. 1255, Dec. 2009.
- [157] R. E. Randall and S. Goodbourn, “Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures,” *J. Gen. Virol.*, vol. 89, no. 1, pp. 1–47, Jan. 2008.

- [158] S. J. Baigent, G. Zhang, M. D. Fray, H. Flick-Smith, S. Goodbourn, and J. W. McCauley, "Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism.," *J. Virol.*, vol. 76, no. 18, pp. 8979–88, Sep. 2002.
- [159] J. Seago *et al.*, "The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3," *J. Gen. Virol.*, vol. 88, no. 11, pp. 3002–3006, Nov. 2007.
- [160] M. Iqbal, E. Poole, S. Goodbourn, and J. W. McCauley, "Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA.," *J. Virol.*, vol. 78, no. 1, pp. 136–45, Jan. 2004.
- [161] C. Balmelli, I. E. Vincent, H. Rau, L. Guzylack-Piriou, K. McCullough, and A. Summerfield, "FcγRII-dependent sensitisation of natural interferon-producing cells for viral infection and interferon-α responses," *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, no. 8, pp. 2406–2415, Aug. 2005.
- [162] O. Bauhofer, A. Summerfield, Y. Sakoda, J.-D. Tratschin, M. A. Hofmann, and N. Ruggli, "Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation.," *J. Virol.*, vol. 81, no. 7, pp. 3087–96, Apr. 2007.
- [163] J. F. Ridpath, "Immunology of BVDV vaccines," *Biologicals*, vol. 41, no. 1, pp. 14–19, Jan. 2013.
- [164] J. M. Scudamore and D. M. Harris, "Control of foot and mouth disease: lessons from the experience of the outbreak in Great Britain in 2001.," *Rev. Sci. Tech.*, vol. 21, no. 3, pp. 699–710, Dec. 2002.
- [165] C. F. Basler and A. García-Sastre, "Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion.," *Int. Rev. Immunol.*, vol. 21, no. 4–5, pp. 305–37.
- [166] J. J. Stark *et al.*, "Interferon-alpha and chemohormonal therapy for patients with advanced melanoma: final results of a phase I-II study of the Cancer Biotherapy Research Group and the Mid-Atlantic Oncology Program.," *Cancer*, vol. 82, no. 9, pp. 1677–81, May 1998.
- [167] V. Fensterl and G. C. Sen, "Interferons and viral infections," *BioFactors*, vol. 35, no. 1, pp. 14–20, Jan. 2009.
- [168] R. Moqbel and J. J. Coughlin, "Differential secretion of cytokines.," *Sci. STKE*, vol. 2006, no. 338, pp. 1–5, 2006.
- [169] M. B. Iversen and S. R. Paludan, "Mechanisms of Type III Interferon Expression," *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 30, no. 8, pp. 573–578, 2010.
- [170] A. C. Stanley and P. Lacy, "Pathways for Cytokine Secretion," *Physiology*, vol. 25, no. 4, pp. 218–229, 2010.
- [171] P. K. Reddy *et al.*, "Increased yield of high purity recombinant human interferon-gamma utilizing reversed phase column chromatography.," *Protein Expr. Purif.*, vol. 52, no. 1, pp. 123–30, Mar. 2007.

- [172] S. Barathiraja, P. A. V. Gangadhara, V. Umapathi, H. J. Dechamma, and G. R. Reddy, "Expression and purification of biologically active bovine Interferon  $\lambda$ 3 (IL28B) in *Pichia pastoris*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 145, pp. 14–18, May 2018.
- [173] Y.-L. Yan, Y. Liu, W.-Y. Cao, X.-F. Bu, Z.-G. Bu, and J.-X. Zheng, "[Human lamada-interferon expressed in BHK-21 cell line and its bioactivity].," *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, vol. 24, no. 10, pp. 950–3, Oct. 2008.
- [174] Y. Lu *et al.*, "[Expression of interferon alpha family gene of Chinese marmot in eukaryotic and prokaryotic cells].," *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, vol. 14, no. 2, pp. 124–8, Feb. 2006.
- [175] E. Andreakos, M. Salagianni, I. E. Galani, and O. Koltsida, "Interferon- $\lambda$ s: Front-Line Guardians of Immunity and Homeostasis in the Respiratory Tract.," *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 1232, 2017.
- [176] W. F. BROWN, "VARIANCE ESTIMATION IN THE REED-MUENCH FIFTY PER CENT END-POINT DETERMINATION.," *Am. J. Hyg.*, vol. 79, pp. 37–46, Jan. 1964.
- [177] E. Peterhans and M. Schweizer, "BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response," *Biologicals*, vol. 41, no. 1, pp. 39–51, 2013.
- [178] C. Bachofen, D. M. Grant, K. Willoughby, R. N. Zadoks, M. P. Dagleish, and G. C. Russell, "Experimental infection of rabbits with bovine viral diarrhoea virus by a natural route of exposure.," *Vet. Res.*, vol. 45, no. 1, p. 34, Apr. 2014.
- [179] O. Franco and A. V. Capozzo, "ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ANTIGENOS DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA ( VDV B ) DE INICIAR LA RESPUESTA INMUNE : INTERACCIÓN CON LAS CÉLULAS D," 2014.
- [180] T. Marcello *et al.*, "Interferons  $\alpha$  and  $\lambda$  Inhibit Hepatitis C Virus Replication With Distinct Signal Transduction and Gene Regulation Kinetics," *Gastroenterology*, vol. 131, no. 6, pp. 1887–1898, 2006.
- [181] J. Klinkhammer *et al.*, "IFN- $\lambda$  prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission," *Elife*, vol. 7, Apr. 2018.
- [182] L. Belloni *et al.*, "IFN- $\alpha$  inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 2, pp. 529–537, Feb. 2012.
- [183] Y. Xia *et al.*, "PASylated interferon  $\alpha$  efficiently suppresses hepatitis B virus and induces anti-HBs seroconversion in HBV-transgenic mice," *Antiviral Res.*, vol. 161, pp. 134–143, Jan. 2019.
- [184] J. Rocha-Pereira, S. Jacobs, S. Noppen, E. Verbeken, T. Michiels, and J. Neyts, "Interferon lambda (IFN- $\lambda$ ) efficiently blocks norovirus transmission in a mouse model," *Antiviral Res.*, vol. 149, pp. 7–15, Jan. 2018.
- [185] A. Ravi *et al.*, "Interferon-induced epithelial response to rhinovirus 16 in asthma relates to inflammation and FEV1.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 0, no. 0, Oct. 2018.
- [186] J. M. Cummins, D. P. Hutcheson, M. J. Cummins, J. A. Georgiades, and A. B. Richards, "Oral therapy with human interferon alpha in calves experimentally injected

with infectious bovine rhinotracheitis virus.," *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*., vol. 41, no. 3–4, pp. 193–7, 1993.

- [187] C. M. Weiner, N. P. Smirnova, B. T. Webb, H. Van Campen, and T. R. Hansen, "Interferon stimulated genes, CXCR4 and immune cell responses in peripheral blood mononuclear cells infected with bovine viral diarrhea virus," *Res. Vet. Sci.*, vol. 93, no. 2, pp. 1081–1088, 2012.