



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**COMPARACIÓN FILOGENÉTICA ENTRE LOS LENTIVIRUS  
DE PEQUEÑOS RUMIANTES (REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)**

## **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:  
VÍCTOR MANUEL DÍAZ SÁNCHEZ**

**ASESOR: DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES - CUAUTITLAN  
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES  
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Comparación filogenética entre los lentivirus de pequeños ruminantes  
(Revisión bibliográfica).

que presenta el pasante: Víctor Manuel Díaz Sánchez  
con número de cuenta: 40400623-3 para obtener el título de :  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Octubre de 2009

PRESIDENTE	<u>Dr. Miquel Angel Carrona Medero</u>	
VOCAL	<u>Dr. H. Alejandro Martínez Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>M.C. Jorge Alfredo Cuellar Ordaz</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Hugo Ramírez Alvarez</u>	

# AGRADECIMIENTOS

Gracias papás por darme siempre su apoyo en los buenos y malos momentos, no solo en lo académico y material, si no también en la vida, lo cual es a veces más difícil, no puedo pedir mejores papás que ustedes, por eso les estoy agradecido, siempre si fue tesis del bicentenario (ustedes me entienden). Gracias Carlos, primero por ayudarme a numerar mi tesis (que quede testimonio de eso), y por ser un gran hermano, que entiende y aguanta a este hermano un poco loco pero que te quiere mucho (te debo una comida por la numeración).

Gracias a mis amigos, a todos los que he tenido el placer de conocer en mi paso por la facultad, ustedes saben quienes son. Aprecio mucho su amistad y apoyo en algun u otro momento de la carrera. Gracias a ustedes.

Por ultimo pero no menos importante gracias a ti Oli, me has apoyado, ayudado y entendido a lo largo de la carrera e incluso antes de que entraramos aquí. Hemos crecido juntos como personas y como novios (eso es lo más importante). Hemos vivido juntos buenos y malos momentos, pero seguimos juntos, y todavía tenemos mucho por delante. Sólo espero que en todo los que hagamos estemos juntos, ese es mi deseo, así como el que tu te desarrolles en todo lo que quieras hacer, logres todas las metas que te propongas en la vida y que siempre seas feliz, creo sinceramente que te lo mereces, porque te conozco y se lo que has vivido y por todo lo que has pasado. Te quiero mucho ratonera.

# INDÍCE

## ABREVIATURAS

## RESUMEN

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1.- Retrovirus</b> .....	1
<b>2.- CLASIFICACIÓN</b> .....	2
<b>3.- MORFOLOGÍA</b> .....	3
<b>3.1 Morfología de los LVPR</b> .....	5
<b>4.- REPLICACIÓN VIRAL</b> .....	7
<b>5.- LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES (LVPR)</b> .....	9
<b>6.- TRANSMISIÓN</b> .....	12
<b>6.1.- Transmisión vertical</b> .....	12
6.1.1.- Ingestión de leche y calostro.....	12
6.1.2.- Infección intrauterina y transplacentaria.....	14
<b>7.- TRANSMISIÓN HORIZONTAL</b> .....	14
<b>7.1.- Contacto directo entre animales</b> .....	14
7.1.1.- Infección vía oral y/o respiratoria.....	14
<b>8.- TRANSMISIÓN SEXUAL</b> .....	15
<b>9.- INFECCIÓN IATROGÉNICA</b> .....	16
<b>9.1.- Mecánica</b> .....	16
9.1.1.- Transferencia mecánica durante el ordeño.....	16
<b>10.- TRANSMISIÓN ENTRE ESPECIES</b> .....	16
<b>11.- SÍGNOS CLÍNICOS</b> .....	17
<b>12.- DIAGNÓSTICO</b> .....	21
<b>12.1.- Aislamiento del virus en cultivos celulares</b> .....	21
<b>13.-TRATAMIENTO</b> .....	22
<b>14.-PREVENCIÓN</b> .....	22
<b>15.- BIOINFORMÁTICA</b> .....	23
<b>15.1.- Conceptos y técnicas principales</b> .....	25
<b>15.2.- Sistemas bioinformáticos</b> .....	27
<b>16.- FILOGENÉTICA</b> .....	29
<b>17.- ÁRBOLES FILOGENÉTICOS</b> .....	32
<b>17.1.- Partes de un árbol filogenético</b> .....	33

17.2.- Tipos de árboles.....	33
<b>18.- CONSTRUCCIÓN DE UN ÁRBOL FILOGENÉTICO.....</b>	<b>36</b>
<b>19.- JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>20.- OBJETIVO.....</b>	<b>38</b>
<b>21.- HIPOTÉISIS.....</b>	<b>39</b>
<b>22.- METODOLOGÍA.....</b>	<b>40</b>
<b>23.- ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES.....</b>	<b>41</b>
<b>23.1.- Caracterización genética de los lentivirus ovinos fenotípicamente distintos de Norte América y su posible origen a partir del virus de AEC.....</b>	<b>42</b>
23.1.1.- Las regiones <i>env</i> de los lentivirus ovinos (OvLV) cepas 85/34 y 84/28 son estrechamente homólogas entre si.....	42
23.1.2.- Las regiones <i>env</i> de los OvLV 85/34 y 84/28 son más homólogas con AEC que con MV.....	44
23.1.3.- Substitución de nucleótidos en los genes <i>env</i> de OvLV 85/34 y 84/28 son homólogos con aquellos de MV.....	46
<b>23.2.- Virus de AEC de Francia y Norte América emergen a partir de MV.....</b>	<b>51</b>
<b>23.3.- Virus de AEC y MV: Especies distintas o quasiespecies, y sus implicaciones para diagnóstico de laboratorio.....</b>	<b>55</b>
<b>23.4.- Análisis filogenético de los LVPR del sur de Brasil.....</b>	<b>57</b>
<b>23.5.- Análisis filogenético y la reclasificación de los LVPR basado en 104 nuevos aislados: Evidencia para regular la transmisión de oveja a cabra y la propagación mundial a través de comercio de animales.....</b>	<b>60</b>
23.5.1.- Análisis filogenético del fragmento <i>gag-pol</i> 1.8 pb.....	62
23.5.2.- Análisis filogenético del fragmento <i>pol</i> 1.2 pb.....	65
23.5.3.- Análisis filogenético de un fragmento RT 279 pb dentro de <i>gag-pol</i> .....	67
23.5.4.- Estatus de AEC en rebaños de cabras y su contacto con ovejas.....	69
23.5.5.- Razas de las cabras.....	69
<b>23.6.- Análisis filogenético de los LVPR subtipo B1 en hatos mixtos: Evidencia de transmisión natural de cabras hacia ovejas.....</b>	<b>69</b>
<b>23.7.- Caracterización molecular y estudio filogenético de secuencias virales de MV y AEC de ovejas y cabras de España.....</b>	<b>71</b>
23.7.1.- Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	71

23.7.2.- Secuencias conocidas de GenBank usadas en filogramas y estudios de conservación de aminoácidos.....	71
23.7.3.- Números de acceso para las secuencias de nucleótidos españoles.....	72
23.7.4.- Conservación de secuencias.....	72
23.7.5.- Análisis filogenético.....	76
<b>23.8.- Análisis filogenético de la región <i>gag</i> que codifica la proteína de matriz de LVPR: Análisis comparativo y de aplicaciones epidemiológicas moleculares.....</b>	<b>82</b>
23.8.1.- Análisis Filogenético.....	83
<b>23.9.- Compartimentalización de los LVPR entre sangre y calostro de cabras infectadas.....</b>	<b>85</b>
23.9.1.- Análisis filogenético.....	88
23.9.2.- Compartimentalización filogenética.....	89
<b>23.10.- Transmisión natural y análisis comparativo de LVPR en las poblaciones de oveja y cabras.....</b>	<b>89</b>
<b>23.11.- Impacto de la transmisión natural oveja-cabra en la detección y control de la infección con LVPR pertenecientes al grupo C.....</b>	<b>92</b>
23.11.1.- Análisis filogenético.....	92
23.11.2.- Análisis de la secuencia <i>gag</i> .....	92
<b>24.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>25.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>107</b>
<b>26.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>108</b>

## FIGURAS

1. Principales genes de los retrovirus.....	3
2. Representación de una partícula retroviral.....	4
3. Visión general del ciclo de vida de los retrovirus.....	8
4. Ileo de cordeo de 10 y 72 horas con marcaje citoplasmático para el antígeno de cápside de MV.....	13
5. Ileo de cordeo de 7 días con marcaje citoplasmático para el antígeno de cápside de MV.....	13
6. Encefalitis severa en un ovino infectado con MV.....	18
7. Ovino infectado con Maedi-Visna.....	19
8. Caprino infectado con Artritis Encefalitis Caprina.....	20
9. Articulaciones carpales con inflamación debido a la infección con Artritis Encefalitis Caprina.....	20
10. Visión general de la bioinformática.....	26
11. Aproximación de una arquitectura genérica de un sistema bioinformática.....	28
12. Cladograma.....	30
13. Filograma.....	31
14. Partes de un árbol filogenético.....	33
15. Árbol filogenético con raíz.....	33
16. Árbol filogenético sin raíz.....	34
17. Árbol filogenético construido a partir de los porcentajes de homología entre las secuencias de la región <i>env</i> de 1.6 kb de cepas de lentivirus ovinos y caprinos.....	45
18. Secuencias de nucleótidos de las regiones <i>env</i> de OvLV cepas 85/34 y 84/28 y otras cepas de lentivirus ovinos y caprinos conocidas.....	47
19. Árbol filogenético (A) de LVPR mostrando la relación entre un aislado caprino francés (CA680) y otros aislados caprinos y ovinos construido a partir de secuencias parciales de ADN del gen <i>gag</i> de CA.....	52
19. Árbol filogenético (B) de LVPR mostrando la relación entre un aislado caprino francés (CA680) y otros aislados caprinos y ovinos construido a partir de secuencias parciales de ADN del gen <i>pol RT</i> .....	53
19. Árbol filogenético (C) de LVPR mostrando la relación entre un aislado caprino francés (CA680) y otros aislados caprinos y ovinos construido a partir de secuencias parciales de ADN del gen <i>env</i> de SU.....	54

20. Árboles filogenéticos obtenidos a partir de secuencias <i>pol</i> (A) y <i>gag</i> (B) de LVPR.....	58
21. Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen <i>gag</i> de LVPR.....	59
22. A.- Árbol filogenético mostrando la relación entre LVPR a partir de secuencias de los genes <i>gag</i> y <i>pol</i> 1.8 kb.....	64
22. B.- Árbol filogenético mostrando la relación entre LVPR a partir de secuencias del gen <i>pol</i> 1.2 kb.....	66
22. C.- Árbol filogenético mostrando la relación entre LVPR a partir de secuencias del fragmento RT 279.....	68
23. Árbol filogenético basado en el LVPR subtipo B1 de tres diferentes granjas de rebaños mixtos.....	70
24. Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de un segmento de <i>pol</i> 1.2 de kb correspondiente a las regiones <i>pol</i> -dUTPasa (a) y <i>pol</i> -integrasa (b) de LVPR.....	73
25. Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen <i>gag</i> -p25 de LVPR.....	74
26. Alineamiento de secuencias de la LTR de LVPR.....	75
27. A.- Árbol filogenético de secuencias del segmento <i>pol</i> 1.2 kb de LVPR.....	76
27. B.- Árbol filogenético de secuencias del segmento <i>pol</i> -integrasa de LVPR.....	77
27. C.- Árbol filogenético de secuencias del segmento <i>gag</i> -p25 de LVPR.....	78
27. D.- Árbol filogenético de secuencias del segmento LTR de LVPR.....	79
28. Relación filogenético entre los LVPR italianos y los obtenidos a partir de bases de datos.....	84
29. A Y B.- Árboles filogenéticos una región de la envoltura de clones virales de LVPR obtenidos de sangre y calostro encontrados en la compartimentalización de LVPR.....	86
29. C Y D.- Árboles filogenéticos de una región de la envoltura de clones virales de LVPR obtenidos de sangre y calostro encontrados en la compartimentalización de LVPR.....	87
30. A.- Árboles sin raíz basados en secuencias del gen <i>pol</i> de LVPR.....	90
30. B.- Árboles sin raíz basados en secuencias del gen <i>env</i> de LVPR.....	91
31. Árbol filogenético basado en una secuencia del nucleótido 437 del gen <i>gag</i> que codifica para la proteína de matriz basado en 46 secuencias de LVPR.....	93
32. Alineamiento de las secuencias correspondientes a los residuos 19-156 de aminoácidos de la proteína de matriz de LVPR.....	94

## CUADROS

1. Clasificación de la familia retroviridae.....	2
2. Morfología de LVPR.....	5
3. Clasificación de LVPR.....	6
4. Homología entre la región <i>env</i> de diferentes LVPR.....	43
5. Cambios en las bases de OvLv de la secuencia del gen <i>env</i> que son diferentes de CAEV-CO pero que son homólogos a las secuencias de MV.....	46
6. Nueva clasificación propuesta para LVPR.....	61
7. Resumen de la sustitución de nucleótidos en las regiones estudiadas entre las secuencias españolas.....	81

## ABREVIATURAS

1. AEC. Artritis Encefalitis Caprina.
2. ADN. Ácido desoxirrebonucleico.
3. ADNc. Ácido desoxirribonucleico complementario.
4. AGID. Inmunodifusión en Agar Gel.
5. ARN. Ácido ribonucleico.
6. ARNm. Ácido ribonucleico mensajero.
7. BLAST. Herramienta de Búsqueda para Alineamiento Local Basico (Basic Local Alignment Search Tool).
8. pb. Pares de bases
9. CA. Proteína de Cápside.
10. DM. Tienda de datos (Datamarts).
11. DW. Almacén de datos (Datawarehouse).
12. ELISA. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
13. FASTA. Proviene de "FAST-ALL" porque busca con cualquier alfabeto, es una extensión de "FAST-P" (proteínas) y "FAST-N" (nucleótido).
14. GenBank. Base de datos de secuencias genéticas del Instituto Nacional de Salud de E.U.A. (NIH).
15. GCG. Grupo de Computadoras Genéticas (Genetics Computer Group).
16. HTU. Unidades Hipotéticas Taxónomicas (Hypothetical Taxonomic Units).
17. kb. Kilobases
18. LTR. Repeticiones de Terminales Largas.
19. LVPR. Lentivirus de Pequeños Rumiantes.
20. MA. Proteína de Matriz.
21. MV. Maedi Visna.
22. NC. Nucleocápside.
23. NJ. Unión del vecino (Neighbour-joining).
24. OLAP. Procesamiento Analítico de Datos.
25. OTU. Unidad Taxonomica Operacional.
26. OvLV. Lentivirus ovino.
- 27. PAML. Análisis filogenético por máxima similitud (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood).**
28. PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

29. RT. Transcriptasa reversa
30. SIDA. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
31. SU. Proteína de Superficie.
32. TM. Transmembrana.
33. UPGMA. Método de agrupación por pares sin ponderar con media aritmética (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).
34. UV. Ultravioleta.

## RESUMEN

La filogenia (del griego: *phylon* = tribu, raza y *genea* = relativo al nacimiento o *génesis*) es la historia evolutiva de los taxones, es decir, los grupos de la clasificación de los seres vivos. El análisis filogenético es la disciplina encargada de su reconstrucción, representada en forma de un árbol filogenético.

En biología el análisis filogenético es la disciplina que estudia las relaciones evolutivas entre las distintas especies, reconstruyendo la historia de su diversificación (filogénesis) desde el origen de la vida en la tierra hasta la actualidad. Esto proporciona el fundamento para la clasificación de organismos.

Los lentivirus pertenecen a la familia de los retrovirus (derivado de un mismo árbol filogenético) en donde se encuentran los virus de la inmunodeficiencia humana, de los simios, felina y bovina, anemia infecciosa equina, el virus de Maedi-Visna (MV) y Artritis Encefalitis Caprina (AEC), estos últimos dos son llamados lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR).

La relación entre el virus de AEC y MV es muy próxima y resulta posible la transmisión entre especies animales (ovinos y caprinos).

El termino lentivirus se refiere al curso de la enfermedad, ya que por lo general, los corderos y los cabritos son infectados en las primeras semanas de vida y los signos clínicos y lesiones se desarrollan años después.

El periodo de incubación de la enfermedad es prolongado (meses o años) el curso clínico evoluciona de forma crónica y progresiva, con un desenlace fatal.

Los animales infectados desarrollan cuadros clínico-patológicos similares, los cuales van desde problemas articulares, del sistema nervioso central, y/o pulmonares, para ambas enfermedades.

La infección por lentivirus ocurre en cabras y ovejas de todo el mundo, y los animales infectados quedan como portadores de por vida. En las dos especies las enfermedades subclínicas son comunes, y la principal ruta de infección es vía ingestión de leche y calostro de animales infectados con el lentivirus.

Sin embargo, en AEC el proceso se caracteriza por la aparición de lesiones linfoproliferativas multiorgánicas basadas principalmente en:

- La forma articular.
- Respiratoria.
- Mamaria, que afecta a las cabras adultas.

- Leucoencefalomielitis, la más rara y de aparición brusca, que aparece sobre todo en cabritos jóvenes (2-4 meses de edad). Esta forma clínica nerviosa también puede afectar a los animales adultos.

Se ha descrito una quinta forma clínica, asociada a una progresiva pérdida de peso (caquexia), sin otras alteraciones clínicas evidentes.

Algunas formas clínicas similares con el MV son:

- Pocas cabras adultas van a desarrollar la enfermedad neurológica similar al Visna ovino.
- Los animales jóvenes que se afectan lo hacen bajo la forma nerviosa. Algunos de estos cabritos pueden desarrollar cuadros neumónicos, pero con escasos signos clínicos, que además quedan enmascarados por cuadros nerviosos.
- La afección mamaria es habitual en cabras (AEC) como en ovejas (MV).

Maedi y Visna son términos procedentes de Islandia que describen la presentación clínica de dos síndromes aparentemente diferentes. Maedi “dificultad respiratoria” es una neumonía progresiva y mortal de la ovejas adultas; Visna “desgaste o enflaquecimiento” es una meningoencefalitis que produce una parálisis progresiva y la muerte.

Cabe destacar que la epidemiología molecular de LVPR está basada en el análisis filogenético de las secuencias genómicas.

El análisis filogenético de las secuencias genómicas virales, ha probado ser de mucha utilidad en diferentes áreas y está remplazando el tipificado antigénico por medio de anticuerpos monoclonales.

La aplicación del análisis filogenético de las secuencias para AEC y MV es de gran importancia para el análisis epidemiológico de los LVPR, y para el estudio de diferencias potenciales en la virulencia entre cepas circulantes y para el diseño de test de diagnóstico que arrojen la detección serológica y molecular.

Originalmente, el virus de MV y el de AEC fueron considerados dos virus distintos poco relacionados. Sin embargo, algunos estudios parecen confirmar que estos virus no son específicos de un solo hospedador.

# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1.- Retrovirus

El nombre *retro* deriva de la transcriptasa reversa (polimerasa de ADN dependiente de ARN) que se encuentra dentro de los viriones de todos los miembros de la familia *retroviridae* (Murphy, 1999).

La familia *Retroviridae* contiene dos subfamilias, la *Orthoretrovirinae* y la *Spumaretrovirinae*. La última está compuesta por un solo género, mientras que la primera incluye seis géneros (cuadro 1). Los viriones son esféricos y envueltos por una doble capa lipídica derivada de la membrana de la célula infectada (Boris-Lawrie *et al.*, 1993).

Son genéticamente diploides con dos copias de sentido positivo de cadenas simples de ARN empacado dentro del virión. En células, el ARN es convertido a una doble cadena de ADN mediante la transcripción reversa. Esta versión de ADN viral, es después integrado dentro del ADN cromosomal de la célula hospedadora, el cual se denomina provirus, permitiendo al virus persistir y producir progenie, tanto como la célula permanezca con vida, y provocando un mecanismo de infección crónica en el hospedero (Boris-Lawrie *et al.*, 1993).

La integración del ADN viral permite al provirus acceder a la maquinaria celular para la expresión del gen viral (Asante-Appiah y Skalka., 1997).

La familia *Retroviridae* incluye patógenos importantes de equinos, bovinos, felinos, roedores, ovinos y caprinos, donde inducen signos tales como, anemias, artritis, inmunodeficiencias y enfermedades degenerativas, y en algunos casos neoplasias (Kim *et al.*, 2004).

## 2.- CLASIFICACIÓN

Los retrovirus actualmente son clasificados dentro de 2 subfamilias y 7 géneros.

**Cuadro 1**  
**Clasificación de la familia retroviridae (Büchen-Osmond, 2008)**

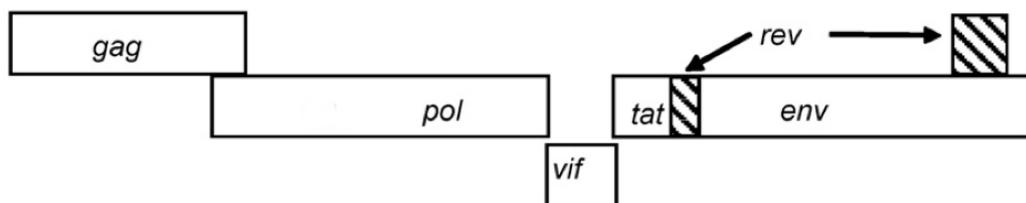
<i>Retroviridae</i>	
<i>Orthoretrovirinae</i>	<i>Spumaretrovirinae</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Alpharetrovirus</li><li>• Betaretrovirus</li><li>• Deltaretrovirus</li><li>• Epsilonretrovirus</li><li>• Gammaretrovirus</li><li>• Lentivirus</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Spumavirus</li></ul>
<i>Retroviridae</i> sin clasificar	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Virus asociados al SIDA</li><li>• Retrovirus AKT8</li></ul> <p style="text-align: center;">Retrovirus de anfibios Sarcoma virus de la vejiga del salmón atlántico Retrovirus de aves</p>	

### 3.- MORFOLOGÍA

La estructura básica del genoma de los retrovirus es similar entre ellos. Estos viriones consisten de una envoltura, una nucleocápside y un nucleoide. Los viriones son de forma esférica a pleomórfica, su medida oscila entre los 80 a 100 nm de diámetro, y están envueltos por una capa hecha de proteínas virales y elementos de la membrana de la célula hospedera (una doble capa lipídica). Presenta proyecciones de superficie, las cuales están densamente dispersas, estas proyecciones son pequeños picos de glicoproteínas distintivas que cubren la superficie, estas miden aproximadamente 8 nm de largo, el nucleoide puede ser concéntrico, o excéntrico (Büchen-Osmond, 2008; Leroux y Mornex, 2008).

Con una longitud de 7000-11000 nucleótidos, los viriones contienen dos copias de cadena simple de ARN. Por medio del gen *gag* (antígeno específico de grupo). El gen *gag* codifica tres proteínas: la proteína de matriz (MA), la proteína mayor de cápside (CA) y la proteína de nucleocápside (NC). Por medio del gen *pol* se codifican enzimas como son: la transcriptasa reversa y la integrasa respectivamente, implicadas en la replicación del ARN viral y su integración dentro del genoma hospedador. Por medio del gen *env* (envoltura) se codifican las proteínas de superficie y transmembranales (Büchen-Osmond, 2008; Leroux y Mornex, 2008). En la figura 1 se muestran los principales genes de los retrovirus.

**Figura 1**  
**Principales genes de los retrovirus**



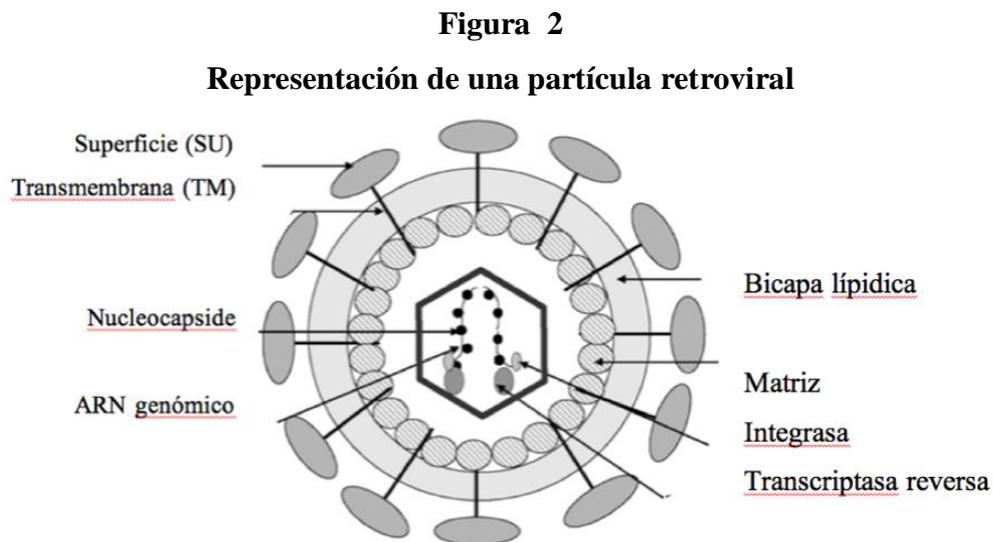
Representación esquemática de la organización de los principales retrovirus que afectan a los pequeños rumiantes (Leroux y Mornex 2008).

Las proteínas del gen *gag* retrovirales son sintetizadas en el citoplasma de la célula infectada, ensamblándose, y formando partículas virales que atraviesan la membrana plasmática. Los genes *pol* y *env* están separados en los lentivirus (Murphy 1999; Demirov *et al.*, 2004).

El genoma de los LVPR tiene genes adicionales no estructurales *vif*, *tat* y *rev*, que tienen que ver con la replicación del virus y la regulación de la expresión genética. En los LVPR, el gen *vif* se requiere esencialmente para la infectividad y mejora la replicación en los macrófagos, codifica una proteína conocida como factor de infectividad viral. El gen *tat* (transactivador) es indispensable para la replicación viral tanto *in vivo* como *in vitro*, este gen procesa funciones tales como la capacidad de bloquear el progreso del ciclo de la célula en la fase G(2). El gen *rev* codifica una proteína que está envuelta en el ARN transcriptasa y su exportación desde el núcleo hacia el citoplasma, haciendo al ARNm viral disponible para la traslación, este gen es indispensable para la replicación viral (Murphy, 1999; Bertoni, 2007; Leroux y Mornex, 2008).

Las LTR son secuencias de ADN flanqueando los genes provirales de los retrovirus, y están compuestas por tres segmentos U3-R-U5. La LTR sirve como sitios de inicio transcripcional. ayudan a ordenar la integración del ADN viral en el genoma de la célula. Contienen señales para la iniciación y poliadenilación del ARN transcriptasa viral y secuencias regulatorias que modulan la eficiencia de la transcripción proviral (Groner y Hynes, 1982).

En la figura 2 se muestra una representación de una partícula viral.



Representación esquemática de una partícula retroviral. (Leroux y Mornex 2008).

Todos los retrovirus son inactivados por solventes lipídicos, detergentes y por calor a 56° C por 30 minutos, pero son más resistentes a los rayos UV y X que otros virus, esto probablemente se deba a sus genomas diploides (Murphy, 1999).

### 3.1 Morfología de LVPR

**Cuadro 2**

	<b>MORFOLOGÍA DE LOS LVPR</b>
<b>Morfología</b>	Los viriones son envueltos con una nucleocapside, una proteína de matriz y un nucleoide. Pueden ser esféricos ó pleomorficos. Miden entre 80-100 nm de diametro. Las proyecciones de superficie están densamente dispersas, pequeñas, y cubren toda la superficie en forma de “espinas”, estas tienen 8 nm de longitud. El nucleoide es concentrico.
<b>Propiedades físicas y fisicoquímicas</b>	Son sensibles al tratamiento con calor, detergentes o formaldehido. Su infectividad no se ve afectada por la irradiación.
<b>Ácido nucleico</b>	El genoma es dimerico segmentado. Tiene sentido positivo. El genoma completo es un monomero de 9200 nucleotidos de largo, el cual está completamente secuenciado, y tiene secuencias redundantes terminales.
<b>Proteínas</b>	El genoma viral codifica proteínas estructurales y no estructurales. Los viriones consisten de 5 proteínas estructurales o mayores, y usualmente se encuentran 4 proteínas no estructurales. Los virus codifican para un RNA-dependiente de DNA polimerasa.
<b>Lípidos</b>	Los lípidos están presentes y localizados en la envoltura, componen el 35% del peso de los viriones. La composición de los lípidos virales derivan de la membrana plasmática de esta célula .
<b>Replicación y organización del genoma</b>	La replicación involucra un paso de transcripción reversa. El genoma que tienen los virus infectantes, tienen cuatro genes principales que codifican las proteínas del virión, en el siguiente orden: 5'-gag-pol-env-3'.
<b>Antigenicidad</b>	Los determinantes antigénicos que poseen reactividad tipo específica se encuentran en la envoltura, específicamente en las glicoproteínas. Los determinantes tipo antigénicos pueden estar envueltos en anticuerpos mediando la neutralización.

(Büchen-Osmond, 2006 (a y b))

Trabajos recientes basados en secuencias largas de aislados de *gag* y *pol* con distribución mundial han demostrado que los LVPR pueden ser divididos en cuatro grupos de secuencia principales de A a D, los cuales difieren entre un 25% y 37% en las secuencias *gag* y *pol*. Las secuencias de los grupos A y B se subdividen en diferentes subtipos que difieren uno de otro entre 15% a 27%. El grupo A contiene por lo menos siete subtipos, de A1 a A7, y el grupo B contiene dos subtipos B1 y B2. Como se observa en el cuadro 3 (Shah *et al.*, 2004 (b)).

**Cuadro 3**  
**Clasificación de LVPR**

Designación del nuevo grupo propuesto	A							B		C	D
Propuesta de nuevo subtipo o designación de clado	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2		
Linaje en la actual nomenclatura	Grupo I	Grupo II	-	-	-	Grupo VI	-	Grupo V	Grupo IV	Grupo III	-
Comentarios y características	Virus parecido a MV tal vez necesite divisiones para formar más de un solo subtipo	Oveja procedente de Norte América	Virus aislados de cabras y ovejas de este estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus aislados de cabras y ovejas de este estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus simple aislado de una cabra de este estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus aislados de cabras y ovejas en el sur de Francia	Virus simple aislado de una cabra presente en este estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus parecido a CAEV <sub>Cor</sub> aislados de cabras de todo el mundo	Virus aislados de cabras y ovejas en el sur de Francia y dos ovejas del presente estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus aislados a partir de cabras en Noruega	Virus simple aislado de una cabra del presente estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)

(Shah *et al.*, 2004 (b))

#### 4.- REPLICACIÓN VIRAL

La replicación retroviral es caracterizada por la transcripción reversa de la cadena simple de ARN viral en una doble cadena de ADN viral. Este ADN proviral es transcrito por el ARN polimerasa celular para producir más ARN viral. El ADN proviral integrado es replicado como un gen celular normal durante la división celular (Groner y Hynes, 1982; Leroux y Mornex, 2008).

El ciclo de vida típico de los retrovirus (figura 3), es único y tiene mucho impacto en la relación virus-hospedero. Primero, el proceso de copiado de ARN a ADN por la transcripción reversa no es completamente exacto, estos errores son introducidos al genoma viral, lo que conlleva a una variación genética en los viriones subsecuentes. Segundo, el proceso de integración lleva a la persistencia del genoma viral en la célula hospedera (Dunham y Graham, 2008).

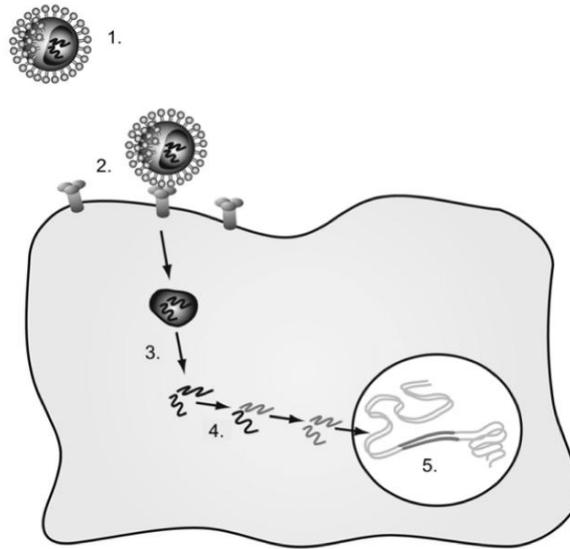
El potencial de los retrovirus para mutar (debido a la transcriptasa reversa) en sus hospederos, lleva a la posibilidad, de que nuevos subtipos se presenten en el futuro. Los sitios de mutación están distribuidos desigualmente; los genes *gag*, *pol* y *env* son conservados así como ciertas partes del gen *env*; otras partes del gen *env* son altamente variables (Murphy, 1999; Dunham y Graham, 2008).

Aunque algunos de estos viriones pueden ser defectuosos debido a su mutación, otros podrían tener alterada su antigenicidad y por consiguiente una ventaja en su supervivencia, permitiéndoles evadir la respuesta inmune del hospedero (Dunham y Graham, 2008).

Los pasos finales de la infección retroviral, comprenden, ensamblaje, gemación y la liberación de las partículas virales de la célula (Kim *et al.*, 2004).

**Figura 3**

**Visión general del ciclo de vida de los retrovirus**



Ciclo simplificado de la replicación general de los retrovirus (Dunham y Graham, 2008).

1. El primer paso de la infección comienza con la partícula viral (Dunham y Graham, 2008).
2. Los viriones se unen a receptores celulares específicos por vía de las glicoproteínas de superficie que interactúan con los receptores de superficie, la proteína *env* viral confiere propiedades que son esenciales para la entrada del virus y la diseminación de partículas retrovirales, el proceso de entrada a la célula se lleva a cabo por medio de dos pasos principales: a) fijación a la superficie de una célula, precediendo la entrada viral, y b) la proteína *env* induce la fusión de las membranas (Dunham y Graham, 2008; Kim *et. al.* 2004).
3. El genoma viral ARN es liberado desde el núcleo viral (Dunham y Graham, 2008).
4. El genoma ARN es copiado por la enzima viral “transcriptasa reversa” haciendo una copia de ADN (ADNc) (retrotransposición). Este ADN es entonces duplicado para producir una doble cadena de ADN, la cual luego entra en el núcleo celular, junto con 50-100 moléculas de integrasa, esto está contenido dentro de una larga estructura de nucleoproteínas, llamada, complejo de pre-integración. El proceso de integración tal vez pueda aprovechar más de un solo camino para acceder al ADN en el núcleo de la célula hospedera. Un análisis hecho al ADN viral de células infectadas, muestran que la preparación para la integración del DNA empieza en el citoplasma (Asante-Appiah y Skalka, 1997; Dunham y Graham, 2008).
5. El ADN viral es empalmado dentro del genoma del hospedador por la proteína viral llamada integrasa, donde puede residir de por vida dentro de la célula del hospedador como un provirus (Groner y Hynes, 1982; Dunham y Graham, 2008).

## 5.- LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES

Los lentivirus, como su nombre lo dice, el prefijo lenti (que significa lento) caracteriza a la mayoría de las enfermedades asociadas a los lentivirus, las cuales, tienen un periodo largo y asintomático antes de que se presenten los signos clínicos característicos. Cabe mencionar que una proporción de estas infecciones permanecen de forma subclínica (Campbell y Robinson, 1998).

MV y AEC son enfermedades denominadas de forma general como lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) que infectan a ovejas y cabras y causan una infección persistente de por vida, induciendo síndromes lentos y debilitantes en un pequeño grupo de los animales infectados (Ravazzolo *et al.*, 2001; Callan y Van Metre, 2004; Pisoni *et al.*, 2007 (a)).

Sirgudsson fue el primero que describió la enfermedad de MV, el estableciendo el termino de “infección lenta” basado en el largo periodo de incubación de virus, su la lenta progresión de los signos y la persistencia del virus (Ravazzolo *et al.*, 2001; Callan y Van Metre, 2004; Pisoni *et al.*, 2007 (a)).

La primera identificación de MV probablemente data de 1915, cuando una neumonía progresiva intersticial fue reportada en ovejas de Sudáfrica, y luego un síndrome parecido fue reportado en una oveja de Montana en 1923. Fue así como MV fue el primero de los lentivirus en ser reconocido como miembro de una categoría de enfermedades lentas (Pasick 1998, Straub 2004).

Medi-visna son términos procedentes de Islandia para describir dos enfermedades progresivas lentas del islándico “maedi” que significa respiración dificultosa, para hacer referencia a la disnea que se presenta, y “visna” que significa “contracción o deterioro”, para referirse a la emaciación y el proceso nervioso que se presenta; En E.U.A es conocida como adenomatosis pulmonar ovina. MV describe la presentación clínica de dos síndromes aparentemente diferentes producidos por el mismo virus. Sin embargo, no fue hasta que una epidemia de MV se desarrollo en ovejas de Islandia entre 1939 y 1952, esta enfermedad recibió seria atención. (Pasick, 1998; Martín y Aitken, 2002; Callan y Van Metre, 2004; Christodouloupoulos, 2006).

En contraste, AEC es reconocido más recientemente como un síndrome en las cabras. Fue primeramente descrito en el noroeste de Estados Unidos seguido de una epizootia de leucoencefalomielitis acompañado por una neumonía intersticial subclínica en cabras jóvenes. Pero el virus no fue aislado hasta 1980 a partir de membranas sinoviales de cabras adultas las cuales presentaban artritis y del cerebro de cabritos los cuales presentaban encefalitis (Pasick, 1998; Ravazzolo *et al.*, 2001; Ali Al Ahmad *et al.*, 2006; Bertoni, 2007).

MV y AEC son consideradas genéticamente como un solo patógeno, las cuales infectan a cabras y a oveja; Estas enfermedades están actualmente reconocidas como de distribución mundial, aunque existen países en los cuales los LVPR nunca han sido reportados, y otros como Nueva Zelanda y Australia, los cuales son libres de estas enfermedades (menos del 1% de los hatos infectados con 99% de probabilidad) de acuerdo con la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), así como Islandia donde el MV fue erradicado. Los LVPR, que son considerado un síndrome multisistémico, que causan pérdidas económicas a la producción de los pequeños rumiantes, se caracterizan por producir inflamación crónica y procesos degenerativos patológicos en sus órganos blanco, como son: cerebro, pulmones, articulaciones, glándula mamaria y sistema nervioso (Martin, 1996; Pasick, 1998; Ravazzolo *et al.*, 2001; Callan y Van Metre, 2004; Straub, 2004; Shah *et al.*, 2004 (a); Benavides *et al.*, 2007; Pisoni *et al.*, 2007 (a); Reina *et al.*, 2008; Gjerset *et al.*, 2009; Amorena *et al.*, 2008).

Estas enfermedades son principalmente transmitidas en etapas tempranas de la vida del animal, principalmente de madre a cría, aunque cabe señalar que existen otros medios de infección. Son enfermedades con degeneración progresiva, que en ocasiones causan la muerte del animal, estos procesos pueden tardar en aparecer, de varios meses hasta incluso años (Blacklaws *et al.*, 2004; Al-Qudah *et al.*, 2006).

Estos virus son transmitidos principalmente a través de calostro o leche contaminada, que es ingerido inmediatamente por la cría después del parto, así como por aerosoles que contengan partículas infectantes. También se ha reportado que puede haber una transmisión entre adultos por medio de las maquinas de ordeño. Cabe destacar que los LVPR han sido detectados en el semen sugiriendo esto una fuente potencial de transmisión. En muchos casos solo la minoría de los animales presenta signos clínicos, estos animales asintomáticos son portadores del virus de por vida y pueden ser una fuente de infección para otros animales (Blacklaws *et al.*, 2004; Callan y Van Metre, 2004; Pisoni *et al.*, 2007 (a); Leroux y Mornex, 2008).

Las principales células afectadas en estas enfermedades son los monocitos/macrófagos, con la médula ósea sirviendo como reservorio de infección. Aunque otros tipos de células como fibroblastos, células epiteliales de la glándula mamaria y células endoteliales también pueden ser infectadas. Una pequeña porción de monocitos es infectada y la diferenciación de monocitos a macrófagos induce la replicación viral. Se ha descrito que los monocitos son los responsables de propagar el virus a diferentes órganos, y es así como el virus evade la respuesta inmune (De Andres *et al.*, 2005; Pisoni *et al.*, 2007 (a); Bertoni, 2007; Mselli-Lakhal *et al.*, 2007; Gjerset *et al.*, 2009).

Así los virus son diseminados en los monocitos por el torrente sanguíneo. El número de monocitos infectados se incrementa al final de la gestación, en concomitancia con la lactación. Es raro observar células expresando el virus activamente en torrente sanguíneo y en tejidos afectados, haciendo difícil estudiar la difusión de la infección y el principio de la patología (De Andres *et al.*, 2005; Pisoni *et al.*, 2007 (a); Bertoni, 2007; Mselli-Lakhal *et al.*, 2007; Gjerset *et al.*, 2009).

A pesar de las diversas respuestas inmunes, que incluyen la producción de anticuerpos neutralizantes y una respuesta inmune mediada por células, el virus no se puede eliminar del organismo del hospedero (Martin y Aitken, 2002).

La alta prevalencia de LVPR alrededor del mundo es una preocupación para la mayor parte de los países productores de pequeños rumiantes, particularmente los industrializados (Ali Al Ahmad *et al.*, 2006).

Por más de 10 años, la reconstrucción filogenética basadas en secuencias parciales de LVPR establecieron claramente que las dos enfermedades están estrechamente relacionadas entre si, con evidencia de infección cruzada entre las dos especies. (Leroux y Mornex, 2008).

## 6.- TRANSMISIÓN

### 6.1.- Transmisión vertical

#### 6.1.1.- Ingestión de leche y calostro

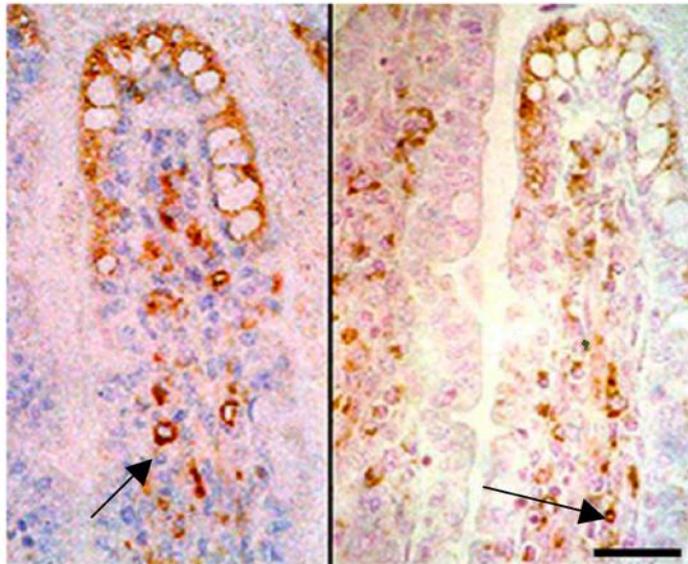
El virus es transmitido por el consumo de leche o calostro infectado con el virus,. El virus ha demostrado estar presente en el calostro y la leche de animales infectados, ya que la glándula mamaria es un órgano blanco reconocido para los LVPR, por esto el virus puede ser encontrado en el tejido mamario, en células epiteliales mamarias *in vivo*, y es capaz de causar lesiones en el órgano, como la mastitis de tipo indurativa. Se ha estudiado que los niveles del virus en el tejido mamario tal vez puedan variar según el estado de lactación, época de parición, así como la inducción a la lactación, pueden estar correlacionados con la expresión del virus (Adams *et al.*, 1983; East *et al.*, 1993; Blacklaws *et al.*, 2004; Callan y Van Metre, 2004; Preziuso *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004 (a); Daltabuit 2005; Christodoulopoulos, 2006; Herrman-Hoesing *et al.*, 2007; Ponti *et al.*, 2008; Reina *et al.*, 2008).

La inducción de mastitis por LVPR tal vez pueda favorecer la transmisión del virus a corderos en etapa de lactación por medio del incremento de células infectadas (macrófagos) en el calostro y leche. La alta permeabilidad del intestino del cordero las primeras 48 horas después del nacimiento, puede facilitar la entrada del virus por medio de la ingestión del calostro, aunque el mecanismo de entrada vía intestino no está todavía muy clara (Preziuso *et al.*, 2004; Pisoni *et al.*, 2007 (a)).

En las figuras 4 y 5 se observan ileos de cordero y su permeabilidad dependiendo de la edad del cordero.

**Figura 4**

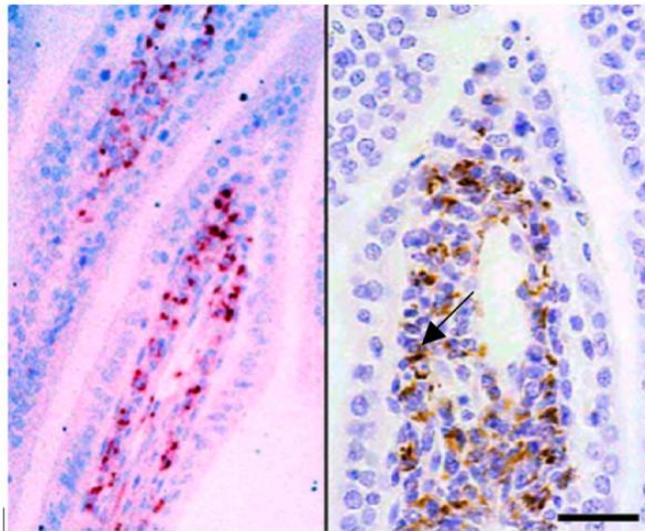
**Ileo de cordero de 10 y 72 horas con marcaje citoplasmático para el antígeno de cápside de MV**



Ileo de ovejas de 10 horas (izquierda) y 72 horas (derecha); marcaje citoplasmático café-rojizo (ver flechas) para el antígeno de cápside de MV en células epiteliales de la punta de las vellosidades y en células mononucleares de la lamina propia; las células epiteliales aparecen fuertemente marcadas en corderos de 10 horas, y en corderos de 72 horas el marcador aparece diseminado. Método ABC con DAB, hematoxilina de Harris. Barra a 63 micrometros (Preziuso *et al.*, 2004).

**Figura 5**

**Ileo de cordero de 7 días con margaje citoplasmático para el antígeno de cápside de MV**



Ileo de cordero de 7 días; marcaje citoplasmático para el antígeno de cápside del MV en las células mononucleares de la lamina propia (izquierda). No hay tñido epitelial presente. Muchas células mononucleares en la lamina propia están marcadas por el anti-macrófago VPM32 (derecha, ver flecha). Método ABC con DAB, hematoxilina de Harris. Barra a 86 micrometros (izquierda) y 50 micrometros (derecha) (Preziuso *et al.*, 2004).

### 6.1.2.- Infección intrauterina y transplacentaria

Es la ruta más controversial de transmisión. La transmisión de LVPR de madre a feto ha sido reportada ocasionalmente. El ambiente intrauterino puede proveer una manera de infección para el feto. Hay evidencia de la infección en el útero en diferentes trabajos en los cuales se reporta que muchos de los animales recién nacidos aislados del contacto de la madre, alimentados con calostro pasteurizado o sustituto de leche, presentaron infección. En otros reportes, el virus fue aislado de corderos obtenidos por cesárea y aun después de haber sido mantenidos en aislamiento de ocho a nueve meses, estos presentaron seroconversión. También se ha reportado el aislamiento de virus en fetos y animales recién nacidos (Cutlip *et al.*, 1981; Blacklaws *et al.*, 2004; Ali Ahmad *et al.*, 2006; Reina *et al.*, 2008).

Algunos trabajos mencionan que los animales pueden infectarse, al contacto con la vagina al momento del parto (Al-Qudah *et al.*, 2006).

## 7.- TRANSMISIÓN HORIZONTAL

### 7.1.- Contacto directo entre animales

El intercambio de animales ya sea por importación o exportación de animales infectados, es considerado como una importante causa de transmisión horizontal de lentivirus de pequeños rumiantes. Se considera que todas las secreciones corporales de los animales pueden ser una fuente de infección. (Dukes *et al.*, 1979; Blacklaws *et al.*, 2004; Callan y Van Metre, 2004; Pisoni *et al.*, 2007; Ali Ahmad *et al.*, 2008)

#### 7.1.1.- Infección vía oral y/o respiratoria

Recientes estudios en Islandia han demostrado que el contacto directo o cercano entre animales fue otro importante factor en la transmisión del virus. Confinar animales y encerrarlos juntos da como resultado un incremento en los rangos de infección, esto puede ser por el intercambio o contacto con aerosoles contaminados provenientes de otros animales, aunque este mecanismo de transmisión no está bien entendido (Blacklaws *et al.*, 2004; Callan y Van Metre, 2004; Peterhans *et al.*, 2004).

Algunos trabajos proponen que la infección se pudiera presentar por el contacto directo cara-cara, por gotas de aerosol contaminadas, así como agua y comida contaminada, esto se ve particularmente en MV, en donde los exudados juegan un rol importante (Blacklaws *et al.*, 2004; Callan y Van Metre, 2004; Peterhans *et al.*, 2004).

También las condiciones de manejo, la sobrepoblación en el corral y una mala ventilación, puede facilitar la exposición al virus (Blacklaws *et al.*, 2004; Callan y Van Metre, 2004; Peterhans *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004 (a); Christodoulopoulos, 2006; Gjerset *et al.*, 2007; Reina *et al.*, 2009).

Se ha descrito que la oveja se infecta después de la inoculación del virus por vía intranasal, intratraqueal o intrapulmonar. Sin embargo, el virus raramente es aislado de la garganta o de la saliva de la oveja infectada, sugiriendo que las secreciones del tracto respiratorio alto no son la principal fuente de infección (Blacklaws *et al.*, 2004)

## **8.- TRANSMISIÓN SEXUAL**

Para ser capaces de predecir la transmisión sexual de los LVPR, es necesario conocer si el virus es excretado en el semen o no (Peterson *et al.*, 2008). Algunos autores sugieren que la presencia del virus en semen se debe a la excreción de las células epiteliales del epidídimo (por la presencia de una epididimitis en el animal) o leucocitos presentes en el semen. Se ha descrito en algunos trabajos, que en ovejas machos que están infectados con LVPR y al mismo tiempo con *Brucella ovis* de forma experimental, se ha detectado en estos animales el virus en el epidídimo, lo cual como consecuencia implicaría que se infectara el semen. Estudios recientes también han demostrado que hay una expulsión intermitente de ADN proviral de LVPR en semen, que junto con el contacto entre hembra-macho, puede ser un factor relevante de transmisión. Otros estudios muestran claramente la presencia de ARNm viral y ADN-proviral en semen de caprinos naturalmente infectados, y en varios tejidos del tracto genital (De la Concha-Bermejillo *et al.*, 1996; Martin 1996; Nord *et al.*, 1998; Blacklaws *et al.*, 2004; Reina *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008; Ali Ahmad *et al.*, 2008).

En la cabra hembra se ha detectado ampliamente ADN-proviral en los tejidos del tracto genital como útero, oviducto, ovario y en las células del *cumulus oophorus* que rodea a los oocitos (Ali Ahmad *et al.*, 2008).

## **9.- INFECCIÓN IATROGÉNICA**

### **9.1.- Mecánica**

La transmisión mecánica por sangre contaminada en agujas, es una ruta de infección teórica, pero no hay artículos publicados sobre esto (Blacklaws *et al.*, 2004).

#### 9.1.1.- Transferencia mecánica durante el ordeño

Dada la evidencia de que la leche de animales infectados contiene el virus, la posibilidad de transmisión existe, y tal vez pueda ocurrir a través del contacto con equipo de ordeño contaminado. (Blacklaws *et al.*, 2004; Pisoni *et al.*, 2007)

## **10.- TRANSMISIÓN ENTRE ESPECIES**

Algunos trabajos filogenéticos de virus de hatos mixtos revelan que los lentivirus no siguen una segregación filogenética, lo cual es evidencia de una transmisión entre especies (Callan y Van Metre, 2004; Germain y Valas, 2006).

Se ha estudiado la transmisión bi-direccional de los LVPR, bajo condiciones naturales. Análisis serológicos han revelado ovejas seropositivas en hatos mixtos, donde las ovejas son mantenidas con cabras seropositivas. Los subtipos A3, A4, A6 y B2 de LVPR han sido aislados tanto de ovejas como de cabras, sugiriendo una transmisión entre especies. Los hatos libres de AEC en Suiza presentan infección, ya que en este país las cabras son mantenidas junto con las ovejas, infectándose las cabras con LVPR lo que supone que la reinfección pudo originarse a partir de las ovejas. MV puede ser transmitido experimentalmente a las cabras, y viceversa, las cabras pueden infectar con AEC a las ovejas. El hecho de que algunos subtipos de LVPR han sido aislados de las dos especies indica que la transmisión entre especies ha ocurrido por lo menos una vez con cada uno de estos subtipos, aunque la frecuencia y la dirección de la transmisión se desconoce. Se ha descrito que hay transmisión entre especies de LVPR del subtipo A4 cuando ovejas y cabras se mantienen juntas, también se ha descrito que una transmisión entre especie puede ser cuando corderos son alimentados con calostro de cabras infectadas con LVPR (Karr *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 2004 (a); Pisoni *et al.*, 2005; Denner, 2007; Pisoni *et al.*, 2007; Gjerset *et al.*, 2007; Gjerset *et al.*, 2009).

## 11.- SÍGNOS CLÍNICOS

La mayoría de los animales infectados son asintomáticos, aunque permanecen como portadores persistentes del virus; estos animales son capaces de transmitir la infección. Tanto en el caso de AEC como en el de MV hay una presentación respiratoria, esta es la forma clínica fundamental en MV, mientras que en el caso de AEC es mucho menos frecuente y podría definirse como esporádica, se desarrolla básicamente en las cabras adultas y es muy rara su presentación en cabritos, cuando aparece, suele hacerlo de forma secundaria a una forma clínica nerviosa. El maedi es la manifestación clínica más habitual: los animales afectados permanecen despiertos y alerta pero muestran una gradual pérdida de condición física. En casos más avanzados se produce una dilatación de los ollares, extensión del cuello y apertura de la boca como consecuencia del problema respiratorio. Con frecuencia las infecciones bacterianas secundarias dan lugar a una bronconeumonía y las vías respiratorias quedan obstruidas por la presencia de exudados; los animales pueden morir dentro de los 6-8 meses siguientes debido a la infección (Becker y Hadar, 1990; Martin, 1996; Campbell y Robinson, 1998; Callan y Van Metre, 2004; Shah *et al.*, 2004 (a); Christodoulopoulos, 2006; Bertoni, 2007).

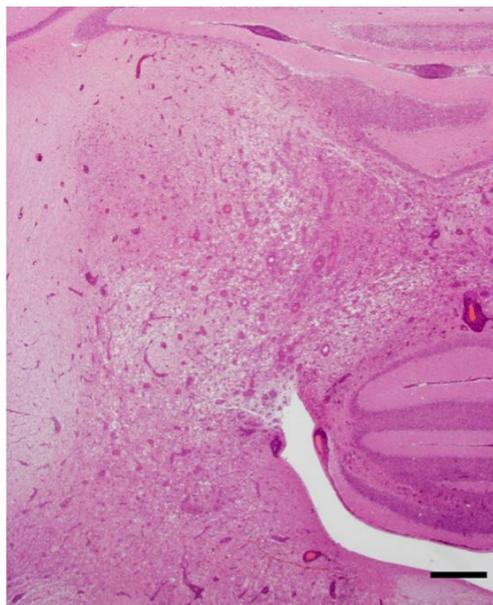
La forma nerviosa de la enfermedad, se produce tanto en AEC como en MV, sin embargo AEC afecta principalmente a cabritos de 1 a 6 meses de edad, aunque también se ha descrito que puede afectar a animales adultos. Se caracteriza por paresia uni o bilateral y ataxia. El visna es menos frecuente, afecta principalmente a hatos que se encuentren muy infectados y se observa más en animales adultos, aunque los animales jóvenes también pueden presentar la forma nerviosa. Se caracteriza por la pérdida de peso progresiva y debilidad generalizada, incoordinación, parálisis de los miembros posteriores (parálisis ascendente), ataxia y tetraplejia. Los signos clínicos del visna están relacionados con la presencia de lesiones del encéfalo o en la médula espinal. En los cabritos (2-4 meses de edad) la forma nerviosa es producida por una leucoencefalomielitis (Martin, 1996; Martin y Aitken, 2002; Contreras y Corrales, 2003; Callan y Van Metre, 2004; Shah *et al.*, 2004 (a); Bisecas *et al.*, 2005; Bertoni 2007).

Las formas nerviosas exhiben cursos más rápidos e incluso pueden mostrar carácter fulminante aunque la duración media se ha estimado que puede variar entre una semana y varios meses o años. Esta forma nerviosa raramente aparece en cabras adultas, evolucionando de forma lenta, con incoordinación, debilidad progresiva, adelgazamiento y finalmente parálisis y muerte (Martin, 1996; Martin y Aitken, 2002; Contreras y Corrales, 2003; Callan y Van Metre, 2004; Shah *et al.*, 2004 (a); Bisecas *et al.*, 2005; Bertoni, 2007).

En el caso de MV ambos procesos suelen estar presentes en el animal o bien pueden ser independientes. Inicialmente se caracteriza por un andar inseguro, sobre todo por las alteraciones en el movimiento de las extremidades posteriores, especialmente por un arrastre unilateral de la pata debido a la parálisis del miembro afectado, lo que da lugar al frotamiento contra el suelo de la pezuña. Pronto se observan tropiezos y el animal camina de rodillas, dando lugar a una paresia posterior y una ataxia, llevando a una tetraplegia dentro de la primera a la tercera semana de la presentación de los primeros síntomas, esto conlleva a la muerte del animal. Otras características son el torneo de la cabeza y/o cabeza colgante, temblores suaves de los labios, aspecto aturdido, separación del resto del rebaño y deambular perdido. También se puede presentar una alteración de visión y ceguera, características no reconocidas hasta hace poco tiempo. No se ve afectado el apetito, y los animales son usualmente afebriles. A diferencia del maedi, el visna evoluciona de forma relativamente rápida, conduciendo a la muerte o a la eutanasia al cabo de pocas semanas (Martin, 1996; Martin y Aitken, 2002; Contreras y Corrales, 2003; Callan y Van Metre, 2004; Shah *et al.*, 2004 (a); Bisecas *et al.*, 2005; Bertoni, 2007).

En las figuras 6 y 7 respectivamente se muestran las lesiones de la forma encefálica en una oveja de España (Benavides *et al.*, 2007).

**Figura 6**  
**Encefalitis severa en un ovino infectado con MV**



Severa encefalitis localizada en los pedúnculos cerebelares y en áreas profundas del cerebelo. Bandas (cuffs) perivasculares, demielinización e inflamación difusa pueden ser observados en la imagen. H.E., Barra = 1mm (Benavides *et al.*, 2007).

**Figura 7**  
**Ovino infectado con Maedi-Visna**



Cordero de cuatro meses con visna, mostrando debilidad de las extremidades posteriores y postura anormal. El animal está inclinado contra la pared y es incapaz de permanecer en posición vertical (Benavides *et al.*, 2007).

La mastitis indurativa es una manifestación clínica importante en algunos rebaños lecheros, también llamada “ubre dura” en las cabras y “bolsa dura” en las ovejas, es una manifestación de progresión lenta. Se puede detectar cuando se realiza una meticulosa palpación de la ubre: no se aprecian alteraciones visibles en el aspecto de la leche. No se han hecho muchos estudios para saber cual es el impacto económico de esta presentación del virus, algunos muestran que no hay repercusiones económicas, mientras que otros mencionan una pérdida de producción del 15% con pobre calidad de la leche. (Contreras y Corrales, 2003; Shah *et al.*, 2004 (a); Bertoni, 2007).

La artritis es una manifestación rara por el virus de MV no así en AEC en donde es la forma frecuentemente encontrada. Afecta articulaciones del carpo, produciendo carpitis, y la inflamación de las articulaciones suele ir asociada con la presencia de cojeras agudas. Se ha visto asociación entre la carga viral y la severidad de las lesiones en las articulaciones. La artritis asociada con la infección por el virus de MV produce engrosamiento visible y, a veces, una coloración rojiza de la membrana sinovial con un aumento del tamaño de la articulación, especialmente del carpo. En ausencia de complicaciones secundarias, el apetito, la temperatura corporal, el estado mental y los valores hematológicos se mantienen normales (Becker y Hadar, 1990; Martin y Aitken, 2002; Contreras y Corrales, 2003; Shah *et al.*, 2004 (a); Chritodouloupoulos, 2006; Bertoni, 2007).

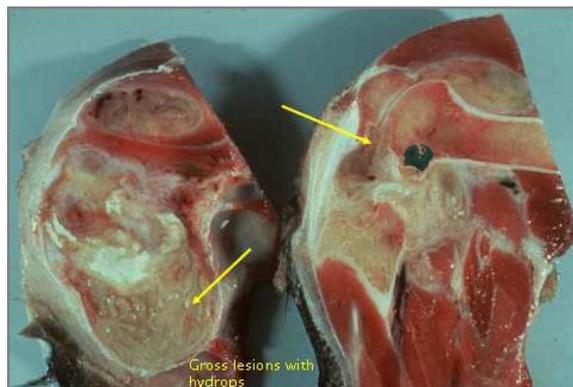
En la figura 8 se muestra una cabra que presenta artritis en las articulaciones carpales y en la figura 9 se muestra la lesión en las articulaciones carpales (Bertoni, 2007).

**Figura 8**  
**Caprino infectado con artritis encefalitis caprina**



Cabra Saanen adulta que presenta artritis clínica. La flecha apunta a la articulación carpal, las cuales presentan inflamación y turgidez (Bertoni, 2007).

**Figura 9**  
**Articulaciones carpales con inflamación debido a la infección con artritis encefalitis caprina**



Severa inflamación en las articulaciones carpales. En la derecha, se observa una importante hipertrofia de la cápsula sinovial, mientras que en la articulación de la izquierda se observan lesiones macroscópicas en las superficie del cartílago (Bertoni, 2007).

También se ha descrito una quinta forma clínica, asociada a una progresiva pérdida de peso, sin otras alteraciones clínicas evidentes, con independencia de otras alteraciones. (Contreras y Corrales, 2003).

## 12.- DIAGNÓSTICO

La enfermedad es raramente observada antes de los dos años, excepto en cabritos, donde la encefalitis se puede volver evidente a pocos meses de la infección (De Andrés, 2005).

Un diagnóstico temprano es esencial para la eficiente prevención y control de los LVPR; este no debe estar basado en signos clínicos, ya que estos aparecen muchos años después de la infección y no son característicos de los LVPR, además, al tratarse de una enfermedad crónica, con un largo período de incubación, los animales que puedan ser diagnosticados clínicamente, hace mucho que fueron infectados por el virus, y, por lo tanto llevan tiempo contagiando a otros animales del rebaño, cabe señalar que la cantidad de virus en la sangre y secreciones tiende a ser muy baja. El diagnóstico se hace usualmente por pruebas serológicas, estas pruebas incluyen inmunodifusión en Agar Gel (AGID por sus siglas en inglés), ELISA (estas dos pruebas son test internacionalmente sugeridos), Western blot y Radio Inmunoprecipitación (aunque esta es raramente usada), estas últimas dos pruebas son útiles como técnicas confirmatorias del diagnóstico. Una desventaja de la inmunodifusión en agar gel es la subjetividad de la interpretación, además de ser inadecuada para analizar leche (Keen *et al.*, 1997; Callan y Van Metre, 2004; Blacklaws *et al.*, 2004; Christodoulopoulos, 2006; Bertoni, 2007; Reina *et al.*, 2008).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es eficiente al detectar la infección por LVPR, con la desventaja que es más costoso que una prueba serológica. La prueba de PCR es útil al confirmar una prueba serológica positiva en una animal de alto valor (Callan y Van Metre, 2004).

Los órganos blanco muestran cambios histopatológico, asociados con infiltraciones de células mononucleares que producen inflamación crónica. Aunque estos cambios no son patognomonicos (De Andrés, 2005).

Un diagnóstico diferencial que puede ser considerado para los LVPR es por ejemplo un absceso espinal, una deficiencia de cobre, poliencfalomalacia y listeriosis (Callan y Van Metre, 2004).

### 12.1.- Aislamiento del virus en cultivos celulares

El virus puede ser aislado de explantes de tejido o por cocultivo infectado con fluidos o con células permisivas, con ambos métodos el efecto citopático característico que provoca el crecimiento vírico es la formación de sincitios (Reina *et al.*, 2008; De Andres, 2005).

El virus de AEC no precisa para su crecimiento en cultivos celulares en cuanto al medio de cultivo o el tipo celular de requerimientos especiales, si bien sólo es capaz de infectar células de rumiantes, a diferencia del virus del Maedi Visna, es capaz de infectar *in Vitro* células de especies no rumiantes (Reina *et al.*, 2008; De Andrés, 2005).

En cualquier caso el aislamiento vírico es poco práctico, caro, complejo, lento y no muy sensible, por lo que no debe ser utilizado como prueba diagnóstica rutinaria. Su principal interés estriba en la producción de antígenos para las pruebas serológicas (De Andrés, 2005).

### **13.- TRATAMIENTO**

Todos los síndromes clínicos asociadas a las infecciones por LVPR, son progresivos e irreversibles. No hay tratamiento que haya demostrado eficiencia para detener por completo la enfermedad (Callan y Van Metre, 2004).

### **14.- PREVENCIÓN**

La prevención está basada en la identificación de animales infectados, minimizar la transmisión entre hembras infectadas y la cría, minimizar el contacto directo entre animales infectados y los que no lo están, y por ultimo eliminar todos los animales infectados. Pruebas serológicas y selección de animales, pueden disminuir la prevalencia en un hato. Los programas iniciales de pruebas serológicas, deben ser repetidos por lo menos cada seis meses, para poder erradicar la infección de un hato, y continuar con un examen anual para asegurar la negatividad del hato. La erradicación de la infección en un hato muy grande tal vez sea impráctica y no costeable, ya que al tener que eliminar a todos los animales infectados, aumentan los costos para poder reponer a los que tuvieron que ser eliminados (Callan y Van Metre, 2004).

## 15.- BIOINFORMÁTICA

La bioinformática, biología computacional o biocomputación es el campo de la ciencia, donde la biología, las ciencias de la computación y las tecnologías de la información se unen en una sola disciplina, la cual es de análisis cuantitativo de información relacionada con macromoléculas biológicas con la ayuda de computadoras. Este campo interdisciplinario comprende la investigación y desarrollo de herramientas útiles para llegar a entender el flujo de información desde los genes a las estructuras moleculares, a su función bioquímica, a su conducta biológica y, finalmente, a su influencia en las enfermedades y características agronómicas. La década de 1980 a 1990 vio el establecimiento del GenBank y el desarrollo de rápidos algoritmos para búsquedas en bases de datos como FASTA de William Pearson y BLAST de Stephen Altschul *et al.*, por otra parte, el uso masivo de internet en los años siguientes hicieron posible el acceso inmediato, intercambio y disseminación de datos biológicos. En términos generales la bioinformática ganó prominencia como una disciplina debido al avance en los estudios sobre el genoma humano que produjeron grandes cantidades de datos biológicos (Lee, 2003; Hernández, 2008; Wikipedia, 2009; Rodríguez, 2009).

La explosión de información sobre secuencias genómicas generaron una demanda de herramientas computacionales eficientes para manejar y analizar los datos, el desarrollo de estas herramientas dependió del conocimiento generado en disciplinas tan diversas como las matemáticas, la estadística, las ciencias computacionales, las tecnologías de la información y la biología molecular, la mezcla de estas disciplinas creó un campo orientado a la información en la biología, el cual es conocido como bioinformática (Lee, 2003; Hernández, 2008; Rodríguez, 2009).

La bioinformática estudia el desarrollo de métodos computacionales y técnicas estadísticas para resolver problemas prácticos y teóricos derivados del almacenamiento, extracción, manipulación y distribución de información relativa a macromoléculas biológicas como el ADN, ARN y proteínas. (Lee, 2003; Altman, 2006; Rodríguez, 2009).

Así, la bioinformática puede tener un impacto profundo en diferentes campos, como la salud humana y animal, agricultura, el ambiente, la energía y la biotecnología (Lopez 2009).

La bioinformática comprende tres especialidades:

- La investigación, desarrollo de infraestructura, sistemas de información y comunicaciones que requiere la biología moderna (Redes y bases de datos para el genoma, estaciones de trabajo para procesamiento de imágenes). Bioinformática en sentido estricto (Hernández, 2008).
- La computación que se aplica al entendimiento de cuestiones biológicas básicas, mediante el modelado y simulación como sistemas de vida artificial, algoritmos genéticos, redes de neuronas artificiales (biología molecular computacional) (Hernández, 2008).
- El desarrollo y utilización de sistemas computacionales (biochips, biosensores, computación basada en ADN) basados en modelos y materiales biológicos. Los computadores basados en ADN se están empleando para la secuenciación masiva y el análisis de diversas enfermedades, explotando su característica de procesamiento paralelo implícito. (Hernández, 2008).

Las principales áreas de investigación en bioinformática incluyen:

- Alineamiento de secuencias
- Predicción de genes
- Montaje del genoma
- Alineamiento estructural de proteínas
- Predicción de estructura de proteínas
- Predicción de la expresión génica
- Interacciones proteína-proteína
- Modelado de la evolución

El objetivo principal de la bioinformática es lograr entender mejor a las células, y la manera en que funcionan a nivel molecular. De esta manera la investigación en bioinformática puede generar nuevas ideas y ofrecer una perspectiva global de las funciones celulares. La bioinformática se ha convertido en algo esencial para la investigación en genómica y biología molecular (Rodríguez, 2009).

El primer reto que enfrenta la bioinformática en la actualidad es el almacenamiento tan grande de información que existe, así como proveer un fácil acceso a esta información; ya que esta no significa nada sin un análisis; así el puro volumen hace imposible incluso para biólogos entrenados hacer una interpretación manual. Aquí es cuando las computadoras extraen la información biológica. La integración de esta información, permitirá un mejor entendimiento de los organismos biológicos (Lopez, 2009).

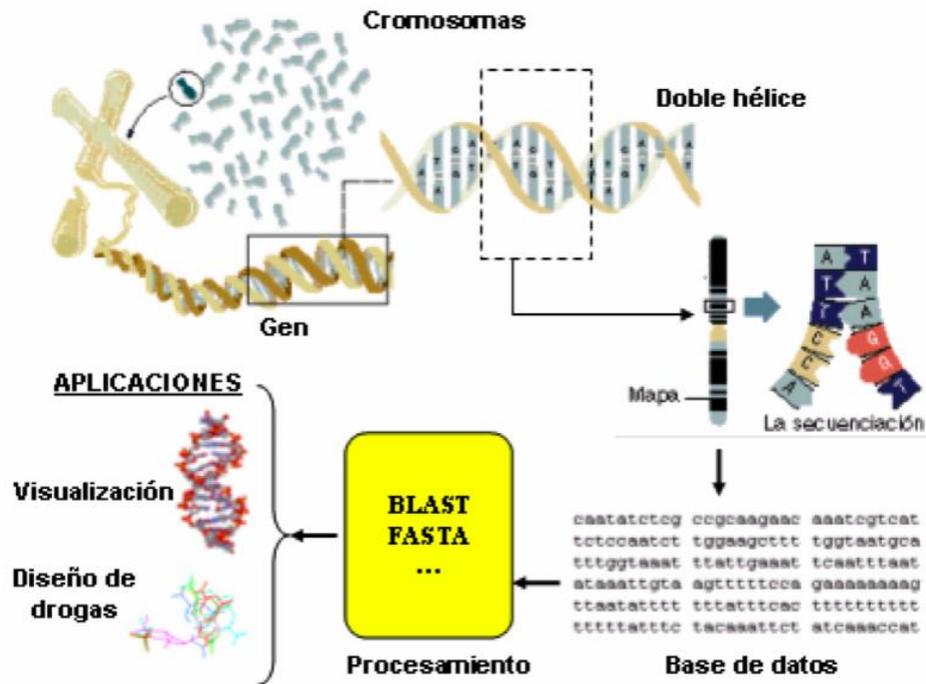
### 15.1.- Conceptos y técnicas principales

Para entender a la bioinformática es necesario conocer algunos términos básicos. Por ejemplo: **genoma** es el conjunto de genes que caracterizan a una especie. Los **genes** agrupados en cromosomas están constituidos de ADN, una molécula que está compuesta por **bases** o **nucleótidos**. Hay cuatro tipos de **bases** para el ADN: adenina (**A**), timina (**T**), guanina (**G**) y citosina (**C**). El genoma tiene las instrucciones generales, y quienes realizan el trabajo de verdad son las **proteínas**. El conjunto de todas las proteínas que intervienen en los procesos biológicos de una especie es lo que se conoce como **proteoma**, y el objeto que se plantea ahora es llegar a determinar la composición, estructura y funciones de todas y cada una de ellas (Hernández, 2008). El principal proceso que realiza la bioinformática es el análisis de secuencias, el cuál consiste en “tratar de encontrar algo” relativo a una secuencia de un aminoácido o un nucleótido empleando técnicas de biología *in silico* (Hernández, 2008).

Este algo puede ser:

- Aprender lo que hace una secuencia de ADN
- Confirmar que la clonación de un gen ha sido exitosa
- Saber si algún ser vivo tiene una proteína similar a los humanos

**Figura 10**  
**Visión general de la bioinformática**



Bioinformática: Estructuras biológicas, datos, procesamientos y aplicaciones (Hernández, 2008)

El análisis puede consistir de tareas como:

- Extraer secuencias de un gen
- Buscar una secuencia en un gen o proteína

Las tecnologías de la información y las comunicaciones ayudan a recolectar, organizar y distribuir información, para emplearse en su análisis y aplicaciones (Hernández, 2008). Básicamente, los sistemas informáticos se emplean en este campo para:

- Adquisición de datos
- Software para visualización
- Programas para el control de reactivos, geles y otros materiales
- Generación y ensamblaje de secuencias
- Análisis de datos
- Programas de análisis de secuencias
- Predicción de estructura de proteínas
- Paquetes de integración y ensamblaje de mapas genéticos
- Software para clasificación y comparación
- Técnicas de inteligencia artificial
- Gestión de datos
- Base de datos locales o accesibles mediante redes de comunicaciones
- Distribución de datos
- Redes de comunicaciones

## **15.2.- Sistemas bioinformáticos**

Las computadoras se usan de varias formas en la biología moderna:

- Recolectan y procesan señales detectadas por equipos de laboratorio (por ejemplo secuenciadores de ADN, espectrografos).
- Supervisan y administran experimentos en laboratorios industriales.
- Almacenan datos en bases de datos públicos y proveen acceso a dichas bases por medio de buscadores u otros mecanismos.
- Extraen patrones y reglas de grandes colecciones de datos y usan los patrones observados para caracterizar y predecir características en nuevas muestras de datos.
- Anotación: uso de métodos de cómputo automatizados para asignar significado a los datos y crear ligas de información entre colecciones de datos diferentes.

- Simulación: La información conocida sobre un sistema, que junto con modelos matemáticos o fisicoquímicos, se usa para simular propiedades del sistema.

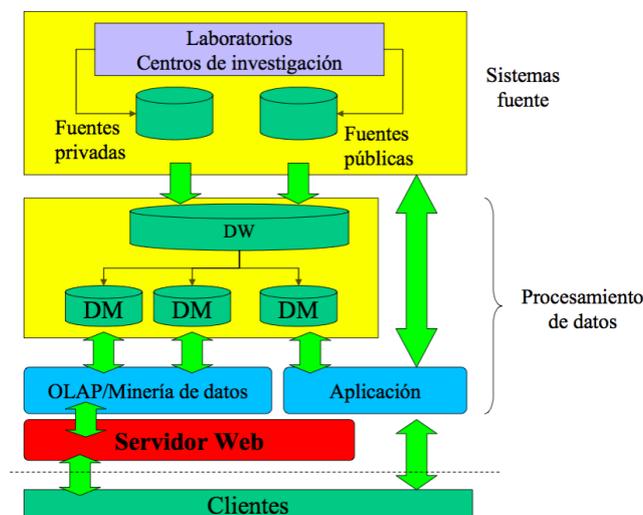
Existen 3 recursos fundamentales que se requieren para la investigación bioinformática: almacenamiento de datos, recursos de cómputo y ancho de banda. La administración del volumen de datos requiere de una infraestructura significativa de hardware y software (Hernández, 2008).

En la figura 11 se muestra un esquema con la aproximación de una arquitectura genérica de un sistema bioinformático, donde los principales componentes son:

- Los sistemas de origen, que son los repositorios de información que se crean a partir de la investigación en laboratorios e institutos; estos recursos pueden ser públicos (GenBank, ProDom, TIGR, RegulonDB, AceDB) o privados (Celera).
- Los sistemas de procesamiento de datos, entre los que destacan los *datawarehouse* (DW), encargados de concentrar y modelar la información para luego crear *datamarts* (DM) de contexto específico. Ya que se tiene la información en una presentación más adecuada puede procederse a explotarla por medio de diferentes herramientas por ejemplo OLAP/minería de datos.
- Los sistemas de explotación (cliente), que pueden ser navegadores de Internet o de clientes propietarios que se comunican con un servidor para procesar información específica.

**Figura 11**

**Aproximación de una arquitectura genérica de un sistema bioinformática**



Aproximación de la arquitectura de los sistemas bioinformáticos representado en un esquema general (Hernández 2008).

En el caso de los sistemas de explotación, muchas tareas comunes en el trabajo con secuencias de ADN y proteínas, por ejemplo lectura, alineamiento, manejo de bases, de datos, etc., son realizadas por medio de programas comerciales, por ejemplo BLAST, FASTA, GCG (Hernández, 2008)

Adicionalmente existen proyectos más orientados a desarrolladores donde se proveen *frameworks* para el desarrollo de aplicaciones bioinformáticas (por ejemplo: BioJava, BioLisp, BioPerl, BioCORBA, bioXML, BSML) (Hernández, 2008).

## **16.- FILOGENÉTICA**

Durante las pasadas décadas, el análisis filogenético se ha convertido en una importante herramienta de la biología para comparar información acerca de genes, individuos, poblaciones, y especies. El análisis filogenético es usado para estimar la relación histórica entre los genes o especies, y describir estas relaciones en la forma de un diagrama ramificado, mejor conocido como árbol filogenético (Hillis, 1997; Acthman, 2001; Hall y Barlow, 2006).

La necesidad de un análisis filogenético se desprende del hecho de que los objetos de estudio, usualmente llamados taxones, ya sean genes, especies, o algún otro nivel de organización no son estadísticamente independientes, sino que están conectados a través de relaciones históricas (Hillis, 1997; Achtman, 2001; Hall y Barlow, 2006; Cates, 2006).

El análisis filogenético tiene muchas aplicaciones, como reconstruir la secuencia de genes ancestrales a través de genes existentes y derivados; estudiar el origen y epidemiología de las enfermedades; inferir la evolución de rasgos ecológicos y de comportamiento a través del tiempo; estimar las relaciones biogeográficas históricas; priorizar la conservación de especies en peligro de extinción; y reconstruir las relaciones históricas a través de toda la vida (Hillis, 1997; Achtman, 2001; Cates, 2006; Hall y Barlow, 2006).

Los estudios de epidemiología molecular de los organismos causantes de enfermedad como los virus, se hizo posible, aunque muchos virus evolucionan rápidamente, y muchas veces tienen miles de sustituciones de sitios nucleótidos por año, puede ser por esto, que estos estudios tal vez solo involucren deducciones de solo algunos años antes (Morrison, 1996; Hillis, 1997; Achtman, 2001; Hall y Barlow, 2006).

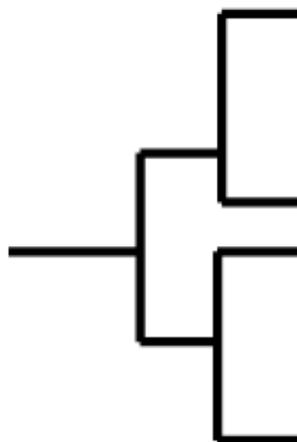
Todas las disciplinas biológicas están unidas por la idea de que las especies comparten una historia en común, y dentro de las ciencias biológicas, la filogenética ha sido relegada a un sector de científicos interesados en la evolución histórica de los organismos. El uso de árboles evolutivos es un paso fundamental en muchos problemas biológicos, para entender la alineación de secuencias múltiples, estructuras de proteínas y predicción de su funcionamiento (Morrison, 1996; Kim y Warnow, 1999; Achtman, 2001; Hall 2003).

La filogenia molecular, se utiliza para obtener información de la evolución y relaciones de un organismo. Es una de las técnicas mas usadas en la biología, este campo se ha desarrollado rápidamente durante las ultimas décadas. El uso de un vocabulario en esta área se ha incrementado así como los softwares utilizados (Morrison, 1996; Huelsenbeck *et al.*, 2001; Achtman, 2001; Ronquist, 2003).

**Cladística.** Rama de la biología que define las relaciones evolutivas entre los organismos basándose en similitudes. Los diagramas evolutivos que produce son llamados cladogramas (Morrison, 1996).

**Cladograma.** En este tipo de árbol sus ramas solo muestran el orden de relación entre los organismos, es un árbol formado usando métodos cladísticos (el análisis cladístico forma la base de la mayoría de los sistemas modernos de clasificación biológica, que buscan agrupar a los organismos por sus relaciones evolutivas). Son diagramas ramificados, similares en apariencia a los árboles familiares que muestran un diseño de relación donde el tamaño de las ramas no son necesariamente proporcionales al tiempo evolutivo entre los organismos relacionados o secuencias. Este tipo de árbol representa un patrón ramificado (figura 12) (Morrison, 1996; Cates, 2006; Porter, 2007).

**Figura 12**  
**Cladograma**



Árbol donde se representa un cladograma, se observa que sus ramas tienen el mismo tamaño (Porter, 2007).

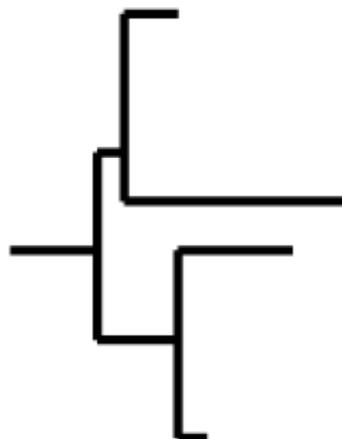
Dos tipos de información evolutiva pueden ser representadas en un cladograma. Primero, el evento de especiación (evento evolutivo que conlleva al origen de nuevos taxones) en la historia evolutiva es representado por la secuencia de ramificación del árbol. Segundo, el evento de filesis (evento evolutivo que modifica un taxón sin ser causa de originar nuevos taxones) puede ser representado por el tamaño relativo de las ramas del árbol (en tal caso este es referido como un filograma). La secuencia de ramificación de un cladograma organiza taxones en grupos monofiléticos (clados), y la mejor manera de discutir el patrón evolutivo representado por un cladograma es en términos de cuales taxones forman grupos monofiléticos de un árbol. Un grupo monofilético es un grupo de taxones descendientes de un solo ancestro y el cual incluye todos los taxones descendientes a partir de este ancestro. Grupos que no incluyen todos los descendientes de su más reciente ancestro común son llamados grupos parafiléticos. Finalmente cabe recordar que un cladograma representa una serie de hipótesis concernientes a una historia evolutiva (Morrison, 1996; Cates, 2006; Porter, 2007).

**Dendograma.** Es un amplio término para la representación en forma de diagrama de un árbol filogenético.

**Filograma.** Es un árbol filogenético que representa explícitamente cambios de números o caracteres a través de lo largo de su rama. Este tipo de árboles se caracteriza por que el largo de sus ramas refleja distancia entre los taxones (figura 13) (Porter, 2007).

**Figura 13**

**Filograma**



Árbol en forma de filograma donde se ve que sus ramas representan distancias estando estas desiguales (Porter, 2007).

## 17.- ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

Un árbol filogenético o un árbol evolutivo, es una estructura matemática usada para representar la historia evolutiva (relaciones de ancestro-descendiente), es la representación gráfica de la relación evolutiva entre grupos taxonómicos (especies biológicas) u otras entidades que se cree tienen un ancestro común. La taxonomía es el sistema de clasificación de plantas y animales por medio de la agrupación de estos dentro de categorías acordes a sus similitudes. En un árbol filogenético, cada nodo con descendientes representa el ancestro común más reciente de los descendientes y la distancia del margen algunas veces corresponde al tiempo estimado. Cada nodo es llamado unidad taxonómica, nodo internos son llamados unidades hipotéticas taxonómicas (HTU's por su siglas en inglés) ya que no pueden ser directamente observadas (Cates, 2006; Vinuesa, 2008).

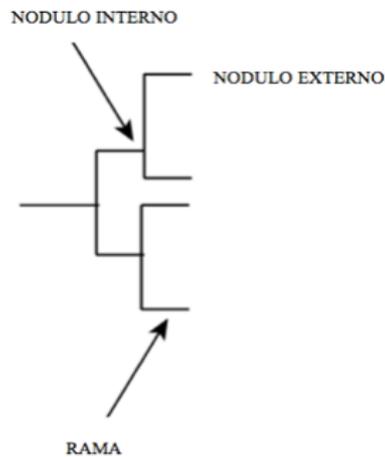
Cada organismo viviente tiene ADN, ARN y proteínas. Organismos estrechamente relacionados, tienen un alto grado de similitud en la estructura molecular, mientras que las moléculas de organismos relacionados de forma distante, muestran poca relación en su estructura molecular. La práctica común es usar estas secuencias biomoleculares como representantes de las especies, así las hojas del árbol están marcadas con secuencias biomoleculares (Durbin *et al.*, 1998; Kim y Warnow, 1999; Porter, 2007).

Se puede usar ADN para detectar cambios entre organismos o secuencias genéticas, que están estrechamente relacionadas, en diferentes especies. Los genes parálogos son genes que están más distantemente relacionados; las secuencias de proteínas pueden detectar relaciones más distantes, se dice que las secuencias de proteínas son más tolerantes de cambios. La filogenia molecular usa esta información para construir un “árbol” que muestre la probable evolución de ciertos organismos. El aproximamiento más común es la comparación de secuencias para genes, usando técnicas de secuencia de alineación para identificar similitud (Durbin *et al.*, 1998; Kim y Warnow, 1999; Porter, 2007).

El primer objetivo científico del estudio filogenético no es resolver un problema de optimización dado, sino recuperar el orden de especificación o eventos de duplicación genética representados por la topología del árbol evolutivo (Kim y Warnow, 1999).

## 17.1 Partes de un árbol filogenético

**Figura 14**  
**Partes de un árbol filogenético**



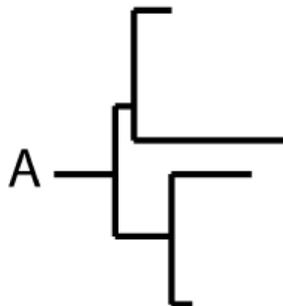
Partes de un árbol esquematizadas (Porter, 2007).

## 17.2.- Tipos de árboles

**Árbol con raíz.** Un árbol con raíz (figura 15), es un árbol directo con un único nódulo correspondiente al ancestro común más reciente de todas las entidades de las “hojas” del árbol (Kim y Warnow, 1999; Porter, 2007).

Los epidemiólogos microbiales y moleculares están concientes de que para hacer una suposición acerca del orden de descendencia a partir de un ancestro común es necesario encontrar la raíz de un árbol filogenético (Aldous, 1995; Achtman, 2001; Hall y Barlow, 2006).

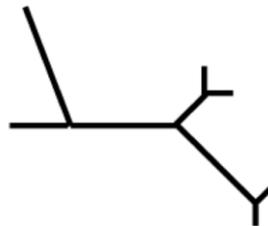
**Figura 15**  
**Árbol filogenético con raíz**



En los árboles con raíz todos los taxones descienden de un ancestro común (Porter, 2007).

**Árbol sin raíz.** Estos pueden ser generados a partir de árboles con raíz omitiendo la raíz, y esta no puede ser deducida en este tipo de árboles (figura 16) (Potter, 2007).

**Figura 16**  
**Árbol filogenético sin raíz**



Esquema de un árbol sin raíz, esta no se encuentra identificada en el árbol (Porter 2007).

La distinción entre árboles con raíz y sin raíz es muy importante, tanto unos como los otros, pueden estar bifurcados o multifurcados. Un árbol bifurcado tiene un máximo de dos descendientes surgiendo de cada nódulo interior, mientras que los árboles multifurcados puede que tengan más de dos descendientes. Un árbol etiquetado tiene valores asignados a sus hojas, mientras que los árboles no etiquetados a veces llamado “forma de árbol” sólo definen una topología (Morrison, 1996).

**Taxón.** En biología, un taxón (del griego *ταξις*, ordenamiento) es un grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados, asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción, y un "tipo", por ejemplo: si el taxón es una especie, es un espécimen o ejemplar concreto; cada descripción formal de un taxón es asociada al nombre del autor o autores que la realizan, los cuales se hacen figurar detrás del nombre. En latín el plural de taxón es *taxa*, y es como suele usarse en inglés, pero en español el plural adecuado es taxones (Mayr, 1996).

La ciencia que define a los taxones se llama taxonomía. La finalidad de clasificar los organismos en taxones formalmente definidos, en lugar de grupos informales, es la de proveer grupos cuya circunscripción, esto es, de qué organismos están compuestos, sea estricta y cuya denominación tenga valor universal, independientemente de la lengua utilizada para la comunicación. Los taxones existen dentro de una clasificación dada, sujeta a cambios y sobre la que pueden presentarse discrepancias, lo que obliga respecto a ciertas denominaciones problemáticas a especificar en el sentido de que autor se está usando el nombre (Mayr, 1996).

Existen dos tipos de taxones:

- **Natural:** Se justifica por las características y la historia evolutiva de sus miembros, de manera que puede decirse que existe en la naturaleza. La sistemática filogenética acepta como taxones naturales a cada especie particular o a cualquier grupo monofilético de organismos, entendiendo como tal solamente a los que forman un clado o rama del árbol de la evolución. La mayoría de los sistemáticos aceptan también como naturales a grupos parafiléticos (“cajón de sastre”) cuyo antepasado común encaja dentro del grupo (Mayr 1996).
- **Artificial:** No existe en la naturaleza, son grupos polifiléticos, cuyo antepasado común no forma parte del grupo. Por ejemplo, las algas o los protozoos. Estos grupos no tienen validez en la clasificación, pero siguen siendo utilizados para organizar ciertas categorías de información científica por su tradición histórica (Mayr, 1996).

**Taxones monotípicos.** Se llama taxón monotípico al que sólo contiene un miembro de la categoría inmediatamente subordinada. Por ejemplo, una familia que sólo contiene un género, sin que importe cuántas especies contenga éste (Wikipedia, 2009).

## 18.- CONSTRUCCIÓN DE UN ÁRBOL FILOGENÉTICO

Los árboles filogenéticos son construidos usando métodos computacionales filogenéticos. Métodos de distancia de matriz (*Distance-matrix*) como *neighbour-joining* o UPGMA, los cuales calculan distancias genéticas a partir de la alineación de secuencias múltiples, son simples de implementar, pero no invocan un modelo evolutivo. Métodos de alineamientos de secuencias, como ClustalW también crean árboles usando algoritmos simples de construcción de árboles. *Maximum parsimony* (parsimonia)<sup>1</sup> es otro método simple de estimar árboles filogenéticos, pero implica un modelo implícito de evolución (Morrison 1996; Felsenstein, 2004).

Métodos más avanzados utilizan el criterio óptimo de máxima similitud (*maximum likelihood*)<sup>2</sup>, siempre dentro de un marco de trabajo Bayesiano, y aplica un explícito modelo de evolución para la estimación de árboles filogenéticos (Morrison 1996; Felsenstein, 2004).

---

<sup>1</sup> **Parsimonia.** Método para la deducción de árboles filogenéticos. La motivación para el criterio de parsimonia es la observación de si la evolución es asumida para operar sólo a través de puntos de mutación, por ejemplo la sustitución de un nucleótido por otro (Kim y Warnow, 1999; Vinuesa 2009).

<sup>2</sup> **Similitud máxima.** Permite de una forma algorítmica incorporar una perspectiva modelo-teórica de la secuencia de evolución. Para la estimación de similitud máxima, se evalúan la topología de un árbol dado por una óptima determinación numérica local para los parámetros de margen de peso, y la búsqueda a través de diferentes topologías de árboles (Vinuesa, 2009; Kim y Warnow, 1999).

## **19.- JUSTIFICACIÓN**

Conocer la evolución que han tenido a través del tiempo los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR), permitirá conocer su posible ancestro común y la forma en que estos se han diversificado y evolucionado, con el fin de poder identificar sus mutaciones, los cuales repercuten en el diagnóstico y control de la enfermedad. Además el entender su comportamiento genético podrá ayudar a comprender cada cuando ocurre esta diversidad genética, así como el por qué existe una transmisión ovino-caprino y viceversa.

## **20.- OBJETIVO**

Demostrar la relación filogenética que existe entre los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) a partir de la recopilación y análisis de artículos científicos, memorias de congresos, reuniones, cursos, artículos de revistas especializadas, etc., que se encuentren en las bases de datos referentes al tema.

## **21.- HIPOTÉISIS**

Existe suficiente información acerca de la filogenia de los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR). Existe además alguna diferencia entre los LVPR tanto en su forma clínica como en su evolución filogenética.

## **22.- METODOLOGÍA**

Recopilación de memorias de congresos, reuniones, cursos, artículos de revistas especializadas, bases de datos, artículos científicos, etc., donde se estudie la relación filogenética entre los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) que se encuentren en las bases de datos científicos, así como el análisis de estos, ya sea por medio de diagramas, imágenes, árboles, o cuadros.

## 23.- ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES

En 1981 los lentivirus de cabras y ovinos fueron reconocidos como virus estrechamente relacionados entre sí basados en su reactividad cruzada. Posteriores reportes confirmaron que MV y AEC tienen al menos un epítipo en común en cada una de sus proteínas estructurales. A pesar de la evidencia mostrada de que MV y AEC están estrechamente relacionados antigénicamente, fue también reconocido que ambos virus tienen la capacidad tener variaciones antigénicas significantes dentro del mismo animal infectado (Pasick, 1998).

La visión tradicional de que MV y AEC son causados por distintos agentes debe ser desechada, y en su lugar los LVPR deben ser visto como un grupo de quasiespecies. Este término es definido como una compleja población de especies de diversas entidades que actúan como una sola. Muchos estudios epidemiológicos han demostrado que AEC y MV están muy relacionados, diversos estudios filogenéticos han llevado a la idea de que tal vez no sea muy exacta la clasificación de los LVPR basado en la especie hospedera (Pasick, 1998; Grego *et al.*, 2005; Pisoni *et al.*, 2007).

Cuando se hace un estudio epidemiológico, la meta es determinar la causa o la fuente de algún fenómeno relacionado que esté afectando a una población; así como la distribución de ese fenómeno en la población; mientras que la fuente de muchas enfermedades tanto crónicas, como de comportamiento infeccioso o no infeccioso, puede ser determinado por el estudio de algunas características, comportamientos, o el ambiente donde se encuentra la población; aunque muchas veces resulta difícil encontrar la fuente de enfermedad infecciosa dentro de una población por medio de estos métodos. (Hall y Barlow, 2006).

La epidemiología clásica traza la diseminación de la enfermedad del agente infeccioso en el hospedador junto con el análisis de los patrones de la enfermedad o la seroconversión inducida en una población de riesgo. En contraste la epidemiología molecular, la cual está basada en el análisis filogenético de las secuencias genómicas, puede ser vista como un estudio epidemiológico que provee información acerca del agente al conocer el pasado de este. Dado el alto rango de evolución de los agentes infecciosos en comparación con los hospedadores, su diseminación en una población reflejada en términos de evolución genómica, acumuladas a través del tiempo desde el origen del agente epidemiológico. Esto es más particular para los virus, los cuales han tenido altos rangos de evolución. El análisis filogenético de las secuencias genómicas virales ha sido de gran utilidad tanto en el área de epidemiología como en muchas otras áreas, y está reemplazando el tipado antigénico por medio de anticuerpos monoclonales (Zanoni, 1998).

El análisis filogenético de los LVPR está basado principalmente en sus genes *gag*, *pol* y *env*, con pocos estudios de comparación de genes regulatorios o de LTR (Ravazzolo *et al.*, 2001).

La aplicación de un análisis filogenético tanto a las secuencias de AEC como a las de MV es de crucial importancia para el análisis epidemiológico de las infecciones con LVPR, y para estudiar potenciales diferencias entre la virulencia que circula entre las cepas existentes de los LVPR. Se ha visto que la clasificación de los LVPR basado en sus especies hospederas es incorrecto, ya que muchos análisis filogenéticos han demostrado que tanto ovejas como cabras se infectan con LVPR que son considerados específicos de la otra especie (Pisoni *et al.*, 2006; Gjerset *et al.*, 2007).

### **23.1.- Caracterización genética de los lentivirus ovinos fenotípicamente distintos de Norte América y su posible origen a partir del virus de AEC**

Secuencias de ADN de 1.6 kb del gen *env* derivadas de los lentivirus ovinos (OvLV) 85/34 y 84/28 fueron analizadas junto con las correspondientes secuencias derivadas de los virus tipo MV cepa 1772 tipo de islandia, MV británica cepa EV1, y el MV de Sudáfrica cepa SA-OMVV, así como un aislado tipo AEC de Norte América cepa 75663. Las secuencias del gen *env* de los OvLV de Norte América, SH11 y SH8, fueron obtenidas por en un estudio. La región *env* del virus de la inmunodeficiencia bovina fue incluido en este análisis como un grupo externo (Karr *et al.*, 1996).

23.1.1.- Las regiones *env* de los lentivirus ovinos (OvLV) cepas 85/34 y 84/28 son estrechamente homologas entre si

Para amplificar el ADN viral de las células de la membrana sinovial de cabras infectadas con alguno de los dos OvLV, se probaron los primers específicos para las regiones *env* tanto de MV como de AEC. Mientras que los intentos de amplificar ADN usando primers específicos para el genoma de MV cepa 1772 no obtuvieron éxito alguno, la amplificación por PCR usando primers específicos para la región *env* de AEC cepa CO produjo productos ADN del tamaño predicho. Las reacciones de PCR usando primers específicos para el gen *env* de AEC produjo productos PCR de 1.6 kilobases que fueron subsecuentemente clonados en el vector pGEM-T y sus respectivas secuencias de nucleótidos determinadas, usando métodos estándares de secuenciación. Cuando se alinearon dichas secuencias de las regiones *env* de los dos virus se encontró que tenían 97.5% de homología entre sus secuencias (cuadro 4). Estos resultados indican una relación estrecha de estos virus y se sugiere que se originaron de un ancestro común (Karr *et al.*, 1996).

**Cuadro 4**  
**Homología entre la región *env* de diferentes LVPR**

Cepa	Cepa								
	CAEV CO	CAEV 63	OvLV SH11	OvLV SH8	OvLV 84/28	OvLV 85/34	MVV 1772	MVV SAOMV	MVV EV1
	Porcentaje de homología								
CAEV-CO		88.8	84.8	84.7	<u>73.4</u>	<u>72.6</u>	63.0	64.4	63.2
CAEV-63	87.6		83.1	83.1	<u>72.8</u>	<u>72.0</u>	62.8	65.8	62.2
OvLV-SH11	83.9	81.3		99.5	70.5	70.0	65.3	67.7	64.1
OvLV-SH8	83.4	80.9	99.1		70.6	70.1	65.3	67.7	64.2
OvLV-84/28	71.8	69.4	70.9	70.4		97.5	<u>67.1</u>	<u>67.9</u>	<u>65.6</u>
OvLV-85/34	71.0	70.4	70.9	70.4	95.9		<u>67.1</u>	<u>68.0</u>	<u>66.0</u>
MVV-1772	61.5	60.0	63.8	62.9	68.8	69.4		78.2	76.7
MVV- SAOMV	65.2	62.9	67.1	66.6	71.4	70.8	85.0		76.8
MVV-EV1	61.6	59.1	62.4	61.5	65.7	65.4	80.6	82.5	

Porcentajes de homología entre las secuencias de los lentivirus ovinos (OvLV) con secuencias de lentivirus ovinos/caprinos conocidas. Resumen de los porcentajes de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos con las regiones *env* 1.6 kb de los OvLV cepas 85/34 y 84/28 obtenidas de alineamiento entre las secuencias OvLV con secuencias con secuencias conocidas del gen *env* de lentivirus ovinos y caprinos, usando el programa DISTANCES. Las homologías de las secuencias de nucleótidos de los OvLV 85/34 y 84/28 comparadas con las cepas de AEC o las tres cepas de MV están subrayadas. La homología de los OvLVs con AEC es de 72.7% con un rango de 72.0-73.4% y la homología de los OvLVs con MV es de 67% con un rango de 65.6-68.0 (Karr *et al.*, 1996).

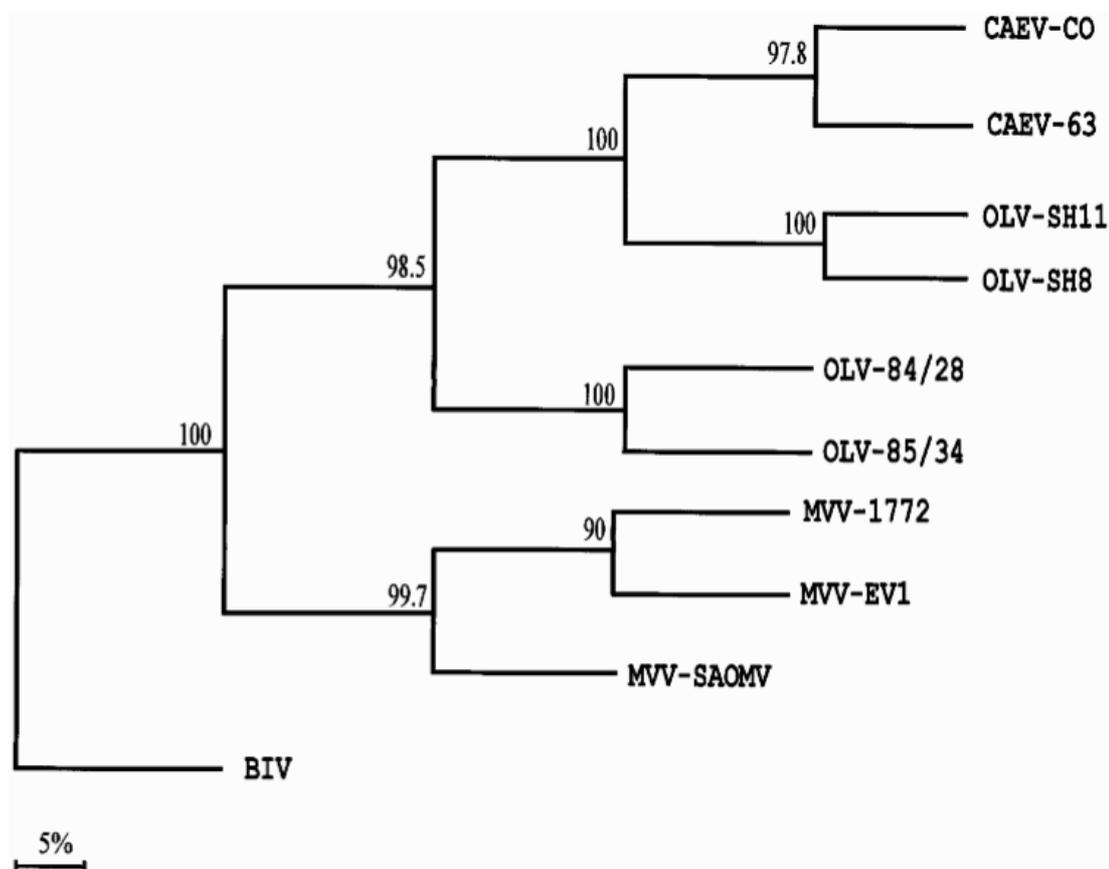
### 23.1.2.- Las regiones *env* de los OvLV 85/34 y 84/28 son más homólogas con AEC que con MV

Los genomas de las tres cepas de MV mostraron tener aproximadamente 80% de homología entre si, mientras que las dos cepas prototípicas de los virus caprinos CAEV-CO y CAEV-63 tienen 85% de homología entre sus secuencias. Sin embargo, cuando se comparan entre si, los lentivirus ovinos y caprinos conocidos, tienen sólo 60% de identidad en sus regiones *env*. Para entender su relación genética con lentivirus ovinos y caprinos previamente secuenciados, se compararon las regiones *env* de los OvLV's 85/34 y 84/28, con las correspondientes secuencias de dos aislados caprinos CAEV-CO y CAEV-63, otros dos OvLV norte americanos (SH11 y SH8) y tres cepas de virus visna ovinos, la islándica MVV-1772, la británica MVV-EV1, y la de Sudáfrica SA-OMVV. La homología entre las secuencias *env* de las cepas de OvLV 85/34 y 84/28 y aquellas de AEC fue de 72.7% con un rango de 72.0-73.4% (Karr *et al.*, 1996).

Sin embargo, comparado las secuencias de estos ovinos con las tres cepas de MV, las secuencias de OvLV compartieron 67% de homología con un rango de 65.6-68.0% (cuadro 4). Análisis similares en las secuencias de aminoácidos también mostraron una homología ligeramente más alta de los OvLV con AEC (70.7%) comparado con MV (68.6%). Los porcentajes de homología en las secuencias en las regiones *env* de estas cepas de lentivirus ovinos y caprinos fueron usadas para construir un árbol filogenético (figura 17). Este análisis asocia los OvLV 85/34 y 84/28 en un grupo con AEC cepas CO y 63 y los OvLVs SH11 y SH8, y lejos de las cepas 1772, SA-OMVV y EV1. Estos resultados sugieren una relación evolutiva estrecha de los OvLV devNorte América con AEC, más que con MV (Karr *et al.*, 1996).

Figura 17

Árbol filogenético construido a partir de los porcentajes de homología entre las secuencias en las regiones *env* 1.6 kb de cepas de lentivirus ovinos y caprinos



Este análisis agrupa los OvLv 85/34 y 84/28 en un grupo con AEC cepas CO y 75663 (63) junto con las cepas OvLVs SH11 y SH8, y lejos del grupo las cepas de MVV-1772, SA-OMVV y EV1. Estos resultados sugieren una relación evolutiva estrecha de los OvLV con AEC, más que con MV. Las distancias de las ramas son proporcionales al número estimado de sustituciones de nucleótidos, y las probabilidades de bootstrap<sup>3</sup> (en porcentaje) están dadas en cada rama interna. La barra de escala es igual o aproximadamente 5% de divergencia nucleotídica (Karr *et al.*, 1996).

**Cepas de origen ovino:** OLV-SH11, OLV-SH8, OLV-84/28, OLV-85/34, MVV-1772, MVV-EV1, MVV-SAOMV.

**Cepas de origen caprino:** CAEV-CO, CAEV-63

**Grupo externo:** BIV

<sup>3</sup> El método Bootstrap propuesto por Efron en 1979, es una técnica de estimación de la distribución muestral de un estudio estadístico. El procedimiento Bootstrap, consiste en hacer una serie de repeticiones a cada miembro de una muestra, gran cantidad de veces. Una forma corta, se hace tomando una nueva muestra de la misma muestra con reemplazo, ya que cada vez que se selecciona una observación para la muestra, se permite a cada elemento de la muestra original tener la misma probabilidad de ser seleccionado. Por lo tanto, seleccionar una muestra es equivalente a reproducir cada elemento gran cantidad de veces y realizar un muestreo sin reemplazo (Rodríguez y Tamayo, 2008).

23.1.3.- Substitución de nucleótidos en los genes *env* de OvLV 85/34 y 84/28 son homólogos con aquellos de MV

En el alineamiento de las secuencias *env* mostradas en la figura 18, se observó que muchas de las substituciones de nucleótidos en las secuencias de los OvLV, los cuales distinguen esos virus de CAEV-CO fueron homólogos con aquellos a partir de MV, MVV-1772, SA-OMVV y/o EV1. La cuantificación del número de estos tipos de substituciones en la secuencia *env* del OvLV 85/34 mostró que aproximadamente el 43% del total de los cambios de bases en esta secuencia diferente de la secuencia de CAEV-CO, pero que fueron homólogos para MVV-1772 como se muestra en el cuadro 5 (Karr *et al.*, 1996).

**Cuadro 5**

**Cambios en las bases nucleótidas de OvLv de la secuencia del gen *env* que son diferentes de CAEV-CO pero que son homólogos a las secuencias de MV**

Cepa	MVV1772	SA-OMVV	EV1
OvLV	148/354	153/354	155/354
84/28	<b>42%</b>	<b>43%</b>	<b>44%</b>
OvLV	156/365	157/365	162/365
85/34	<b>43%</b>	<b>43%</b>	<b>44%</b>
OvLV	100/229	101/229	81/229
SH11	<b>44%</b>	<b>44%</b>	<b>35%</b>

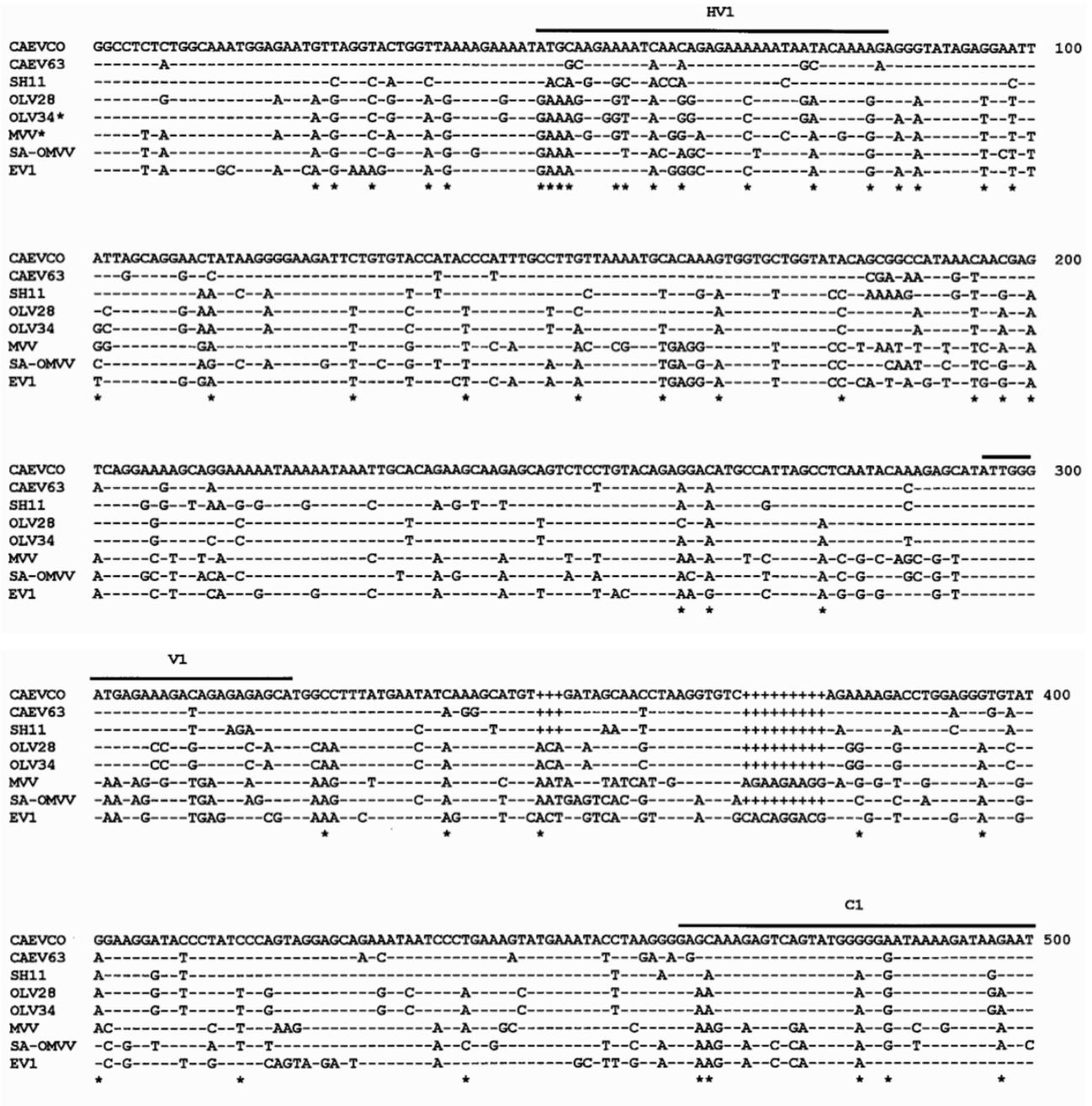
Resumen de los cambios de bases de OvLV de la secuencia del gen *env* que son diferentes de CAEV-CO, pero que son homólogos a las secuencias de visna. Este cuadro resume el porcentaje de cambios en los nucleótidos en la secuencia del gen *env* 1.6-kb de los OvLV cepas 85/34 y 84/28 y SH11 las cuales se desvían de la secuencia CAEV-CO, pero son homólogos a los nucleótidos correspondientes de las secuencias de los virus visna cepas MVV-1772, SA-OMVV, y EV1. El número de los cambios en los nucleótidos diferentes de CAEV-CO, pero homólogos a los correspondientes a los virus visna dividido entre el total de cambio de nucleótidos de CAEV-CO y el porcentaje (en negrita) son mostrados bajo el título de cada cepa respectiva de MV (Karr *et al.*, 1996).

Similitud 43%-44% del total de los cambios de bases a partir de CAEV-CO en las secuencias *env* de OvLVs 84/28 y SH11 fueron homólogos para MVV-1772. Comparados con cada una de las secuencias de los virus MV, cerca del 42%-44% de los cambios en los nucleótidos en las secuencias de los OvLV fueron homólogos a una secuencia específica. Con solo una excepción (SH11 versus EV1) todos los porcentajes estuvieron por arriba de 33% que sería esperado si estos cambios ocurriera de forma aleatoria. Estos resultados son sugestivos de un estado de evolución en estos genomas OvLV hacia el genoma de los virus visna en ovejas (Karr *et al.*, 1996).

En la figura 18 se muestra una alineación de nucleótidos de LVPR de las regiones del gen *env*.

Figura 18

Secuencias de nucleótidos de las regiones *env* de OvLV cepas 85/34 Y 84/28 y otras cepas de lentivirus ovinos y caprinos conocidas



Secuencias de nucleótidos de las regiones *env* de los OvLV cepas 85/34 y 84/28 y lentivirus ovinos y caprinos conocidos. Secuencias de nucleótidos dentro de la región 1.6 kb del gen *env* fueron alineadas. De arriba hacia abajo están las secuencias correspondientes a los aislados caprinos de Norte América, CAEV-CO y CAEV-63, los OvLVs norteamericanos SH11, 84/28 y 85/34, y los virus visna cepas MVV-1772, SA-OMVV y EV1. (-) significa homología; (+) nucleótidos borrados. Regiones conservadas (C1 y C2), variables (V1, V2 y V3), e hipervariables (HV1 y HV2) se indican arriba de la secuencia CAEV-CO. Los asteriscos puestos debajo de las secuencias alineadas indican sustitución de nucleótidos en el OvLV 85/34 que son diferente de CAEV-CO pero homólogos a MVV-1772 (Karr *et al.*, 1996).

**Secuencias de nucleótidos de las regiones env de OvLV cepas 85/34 Y 84/28 y otras cepas de lentivirus ovinos y caprinos conocidas (continuación)**

```

CAEVCO  GGAGAATTAATAATACCATTAAACATTAAGAGTGTGGGTAAAATTAGCAAATGTGTGAGAATGGGTAAATGGGACACCCCGGATTGGCAAGACAGAATTA 600
CAEV63  -----C-----G-G-----A-----C-----G-----A-----C-----T-----
SH11    --G-----G-----T-AC-----T-----C-----A-----AT-----A-T-----
OLV28   -----GC-----G-----G-----A-----GC-G-C-----T-----C-----A-----AT-----A-T-----
OLV34   -----G-----G-----A-----GC-GA-C-----T-----C-----A-----AT-----A-T-----
MVV     --G-----TC-CT-TG-----G-----G-GGA-G-G-----T-----G-----G-----A-G-T-TT-C-AGT-CA-G-----
SA-OMVV --G-----G-GC-CCTCTCT-G-----G-----G-G-A-G-T-----T-A-----G-----A-TT-----AGT-CA-----A-----
EV1     -----C-G-TC-T-----G-----C-----G-A-G-G-----T-A-----GT-----G-----A-T-----T-----AGT-CA-----G-----
                *                * *                *                *                * *
    
```

```

CAEVCO  ACGGATCCAAAGGAATAAATGGGACGCTCTGGGAGAGCTTAACAGTATGCATCACCTAGGATTGCCCTTAGC+++++CAGAACGGCAAATGGTGTA 700
CAEV63  -----A-----C-----G-G-----T-----A-----T+++++-----T-A-G-----
SH11    --G-A-----G-----G-----C-T-C-----T-----G-----T-C-T+++++-----G-T-----
OLV28   --G-G-T-G-----T-----C-T-----A-----A-----T-G-C-----G-----T+++++T-T-----GC-----
OLV34   --T-G-T-G-----T-----C-T-----A-----A-----T-G-C-----C-G-----T+++++T-T-----GC-----
MVV     --T-GAGT-C-----G-----T-A-AAGG-----TAT-GAA-AGGA-CAT-A-----T-----G-G-AA-A-----AGTAAC-CAG-GA-AGGGATA-----
SA-OMVV --G--AG-C--C--C-----AGA--TAC-G-A-AGGA-CAT-A-C-----T-----G-A-AATA-A-----TAGTAAC-CTG-GAAGGG-CT-----C-----
EV1     --T--AG--C-----CAGA--TAT-GAA-AGGATCAC-----C--TT-----G-CAA-A-----TAGTAAC-CTG-GCAGGGGATT--C-----
                * * *                * *                *                *                *
    
```

V2

```

CAEVCO  CTACACCGGGAAATAAATAGGGCAAGAAACATTCCAATATCATTACAAGCCAACTGGAAGTGTACCGGGAATTGGACGCAATATCCGGTGTGGCAA 800
CAEV63  -----A-AA-----A-----G-----TCC-----C-T-----T-----
SH11    --TT--AAA-A-----A-----GAG--TCC-----C-T-----G-G-----T-T-A-----C-----A-----C-A-A-----
OLV28   --T--AC-AAGC-----GA-----C-----C-----CT-----T-C-----CA-----CT-G-CA-----AG-CC-C-----ACA-----G-----
OLV34   --T--AA-AAGC-----GA-----C-----T-C-----CT-----T-----CA-----CT-G-CA-----AG-CC-C-----ACC-----G-----
MVV     --TT--A-A-----C-TTGA-----GGC--C-A-----C-----T-----T-C-----CTCA-----T-----T-ACAA-----AGGTC-C-A-A-----C-----
SA-OMVV T-TT--GAA-----T--TGGA-----AGGG--T-G-----G-----G-T-A-CTCA-----T-----T-ACAA-----AGG-----A-----T-----
EV1     --T--AAA-----G-TTTGG-----AGG--A-----G-G-----G-T-CA-CTCA-----T-----CT-GAAA-----AGG-C-----A-A-----T-----
                * * *                **                * * * * *                **                * * * *
    
```

```

CAEVCO  GTGATTAGAAACCTGGATATGGTGAACATATGACAGGAGAAATGTGTGCAGAGACCACAAAGGCACAAATAACAGTAGGAAATGG+++++AACCATAAC 900
CAEV63  -----G--G-TT-----T-----A-----C-----+C--+-----AATCA-----
SH11    --C-G--G--A-----A-----C-----T-----A-----C-----+++++C-A-----
OLV28   A--CAC--T--TA-C-----A-G--C-----G-----A-G-----G-----C-----+++++G-A-----
OLV34   A--CAC--T--TA-C-----A-----C-----C-----A-G-----G-----C-----+++++C-A-----
MVV     --AT-T--T--T-----ACA-----A-CAG-----A-A-A-----TA-----A-T-----+++++-----A-----
SA-OMVV --T-T--T-TT-A-----ACA-----GA-CAG-----A-----T-----A-T-C-----T-----+++++-----A-----
EV1     --AT-----T-----A-----ACA-----A-CT-T-----A-----G-CTT--A-T-----G-----+++++C-----
                *                *                *                *                *
    
```

Secuencias de nucleótidos de las regiones *env* de OvLV cepas 85/34 Y 84/28 y otras cepas de lentivirus ovinos y caprinos conocidas (continuación)

```

CAEVCO AGGGAATTGCAGTACAACAACCTGGGATGGATGTAATTGCTCAGGATCAGGAAACTACCTATATAACAGCTCTGAGGGAGGATTGTTATTAATTCTGTGC 1000
CAEV63 -----T-----C-----T--A-----A-GACA-----C-A--G-----A-A--
SH11 -----G-----A-G-----T-----A-----C-----G-----A-A--
OLV28 --A-C-----GT-CA--T-----C-----TA-TA-G-----T-----C-----TA-CACA-G--C-----G-----A-T--T
OLV34 --A-C-----GT-CA--T-----C-----TA-TA-G-----T-----C-----TA-CACA-G--C-A--G-----A-T--T
MVV -G-----T--GT-----C--TA-A-G-----TC-TT-G-----A-AA-C-----C-----G-----CA-A--
SA-OMVV -----T--GTC--G-T-----G-C-----TA-A-----T-TT-G-----T--A-ACA-----C-C-G-----AA-A--T
EV1 --A-----T-C-----T-----A-G-----TC-TT-----A-CACA-----AC-G-----A-A--T
                **                * * * * * * * * *
    
```

```

CAEVCO AGACAAAACAGCACCCCTAACAA+++GGATCCTGGGAACAAATACAAATTGGACAACATATGTTGGGAATATACAAAAATGTTTCAGGATGCGAGAATGCAA 1100
CAEV63 --A-T--T-AT--A-----G+++A-AA--T-----C-----ATGT--AG-----G-----A-----
SH11 -----T--AA-----+++A--A--G--G-C-----A--AT--G--TG-G-----C--T--G--A-A--T
OLV28 --G--T-AA-AA--G+++--AA--G-----A--AT--G--TG-G-----C--T--G--A-A--T
OLV34 --G--T-AA-AA--G+++--AA--G-----A--AT--AG--TG-G-----T--T--G--A-A--T
MVV --G-----T--A-----G+++A-AA--G--C--T-----A--AAC--C--C-----C--A--TA-C--CAGT-
SA-OMVV -----TTC--AA-----G+++A-AA--C--T-----AG--TA-A--AGT-
EV1 -----G--A-AA-T--GCAATA--AA-----T-C-----C--C--A-----T--G-----C--A-C--T--CAGC-
                * * * * * * * * *
    
```

C2

```

CAEVCO CATTAGACAACACAGGAGAAGGAACCTTAGGAGGTAGCTAATAAGAAGTGTAGCTTGCCCTCATAAAAAATGAGAGCAACAAGTGGACTTGTGC+++CCC 1200
CAEV63 -C-----GG-A--AGAC-----G-----A-----T--A-----+++T--
SH11 -C-----GG-TT-A-AC-----A-----A--C-TA-----T-----C-A-----+++--
OLV28 -T-----GA-----G--G-GC--AA--AAA--G-T-GG--CGC-A--A--G--A--CTA--A--C--+++TG-
OLV34 AT-----GA-----G--G-GC--AA--AAA--G-T-GG--CGC-ATTA--G--A--CTA--A--CT--+++GG-
MVV GCC-----GA-----TAGT--G--G--ACA--GAAC--CCTT--A-----A--A--C-G-----T-----A--AAGAG--A
SA-OMVV --C-----GA-----CA-C--G--A--G--ACA--AAC--TA--T--C--T--A--G--T-C-----T--A--A--A--AG--A
EV1 -G-----GA-T--GA-T--C--G-----AC-A--CAG--C-TC-----C-A-----C-G-----A-CA-T-CT--C-----AGCAAG
                **                * * * * * * * * *
    
```

**Secuencias de nucleótidos de las regiones *env* de OvLV cepas 85/34 Y 84/28 y otras cepas de lentivirus ovinos y caprinos conocidas (continuación)**

	HV2	SU →← TM	
CAEVCO	<u>ATGCAAAAACAAGAAT+CATAAACAGGAAAAAAGAGA</u> ACTCAGCCACAAGAGGAAGAAGAGAGGGCGTTGGCTTGGTCATTATGCTAGTTATCATGGCAA		1500
CAEV63	-----T-----+T-----A-----C-----C-----		
SH11	----++++G--AT-AGTT-G-T-A-----T-----A-----G-		
OLV28	-CA++++++TG-----C--A-A-G--G-----T-C--C-G-GCTACAA-G--AC--A-A-T-----AG--T-C-----T-		
OLV34	----++++++TG-----T-C--A-A-G--G-----T-C--C-G-GCTACAA-G--AC--GA-A-T-----AG--T-C-----T-		
MVV	TATATGG-GGCGC--GGGGA--A--GGT+++C-AG-AGG-A--T-C-A-----A--GA-A-----T--G-----CC-----		
SA-OMVV	TATCGTG-GA--A-TATG-G--AA-G--GT-C-----A--AGACCA--A-----GA-A--A-----AG--T-C-----T-		
EV1	----++++++TG--GAAA-AT-G+-A--TGCTT+++++T-AGA-AG-A-A-----G--A-A-G-----G-AG--C-C-----		
	*	*	* * *
CAEVCO	TAGTAGCTGCCGCGAGGGCTTCTCTGGGAGTCGCAAACGGCATTACAGCAGTCTTACACTAAGGCAGCTGTCCAGACCCCTTGCTAATGCAACTGCTGCACA		1600
CAEV63	-----C-----C-----		
SH11	----G-----T-----A-----T-----C--A-----C-----		
OLV28	-A-----T-----A--GGA-C-T-T-T-T-CG-G--A-C--A-G-A-G-----CG--C-----T--		
OLV34	-A-----T-----A--GGA-C-T-T-T-T-G-G--A-C--C-G-A-G-----CG--C-----T--		
MVV	-A-C-----T-----A--GG--C-T-----CG-G--A-C--T-C-G-A-G-----T-T-----C--		
SA-OMVV	-A-----T-----A--GGA-C-C-T-T-T-CG-G--A-C--C--A-G--T-T-T-----C-----T--		
EV1	-A-----T-----A--GG--C-T-T-----T-CG-G--A-C--A-G-A-GCT-----T-T-----C-----T--		
	*	* * *	* * * *
CAEVCO	GCAGGATGTGTTAGAGGCAACCTATGCCATGGTACAGCATGTGGCTAAAGGCGTACGAATCTTGGAAGCTCGAGTGGCTCGAGTGGAGCT		1691
CAEV63	-----C-----G-----C-----A-----		
SH11	----A-----A-----A-G-C-----		
OLV28	----A-----T-----G-----GA-A--T-----A-----		
OLV34	----A-----T-----G-----GA-A--T-----A-----		
MVV	----A-----A--T-G-----A-A-C--AA-A--C-A-G-AA--A-G-----		
SA-OMVV	----A--T-----A--A-T-----T-----A--G--A--A-A-AG-A--A-----A-----		
EV1	----A-----A--T-----G-----A--C--A--A--G-AA--T-C-----TC		
	* *	*	

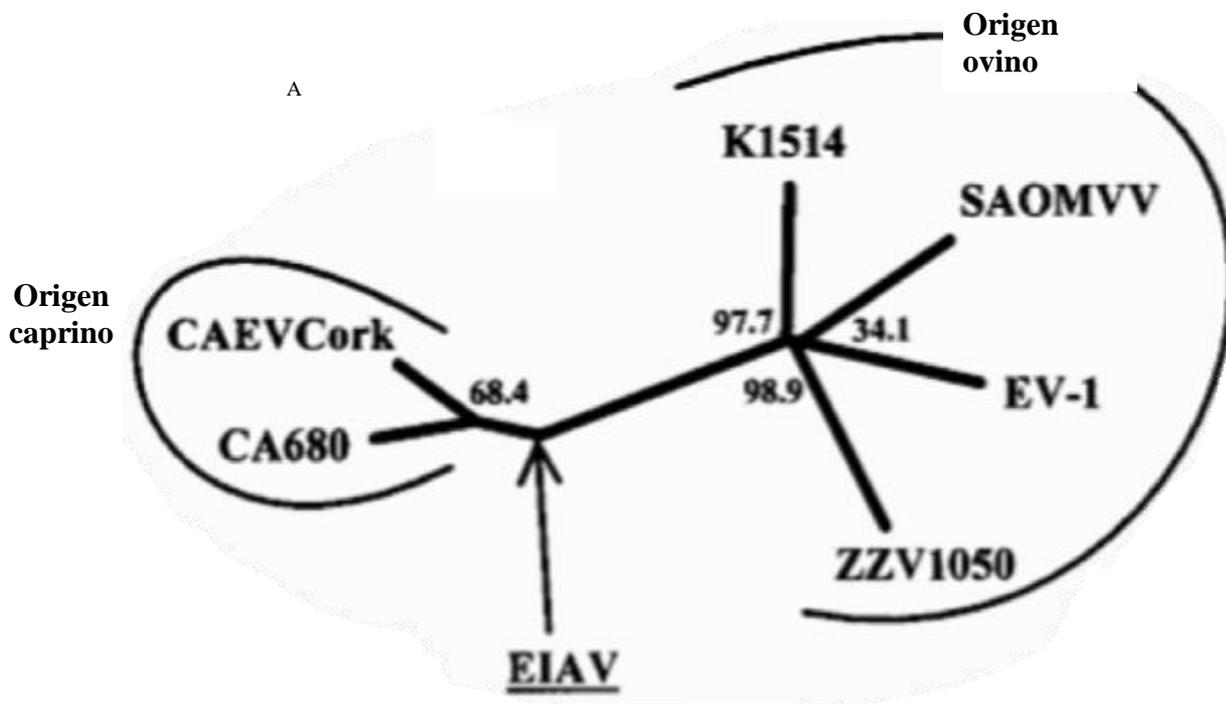
Con este trabajo se demostró que dos cepas de campo fenotípicamente distintas de lentivirus ovinos norte americanos, están estrechamente relacionados entre si genéticamente y que sus regiones *env* son más homólogas a los lentivirus caprinos que a los clásicos lentivirus ovinos. Sin embargo, el análisis de la substitución de nucleótidos en los genes *env* de dos virus, indicaron que cuando las diferencias entre los dos virus y AEC fueron examinadas, los cambios fueron por lo regular homólogos con los genomas de los virus MV. Estos hallazgos sugieren que los dos OvLV norteamericanos tal vez se originaron a partir de AEC o virus parecidos a AEC, posiblemente por transmisión entre especies de forma natural de cabra hacia oveja y la adaptación subsecuente del virus en la oveja por medio de la evolución en su genoma (Karr *et al.*, 1996).

### **23.2.- Virus de AEC de Francia y Norte América emergen a partir de MV**

Los tres árboles filogenéticos que se muestran en las figuras 19 A, 19 B y 19 C, son aislados de AEC y MV derivados a partir de secuencias parciales de genes ADN de los genes *gag* CA (figura A) *pol* RT (figura B) y *env* SU (figura C). Las relaciones filogenéticas fueron determinadas por el método Filch. Todos los árboles tienen raíz que está indicada por la flecha en cada uno de los árboles; no así con el lentivirus de anemia infecciosa equina (EIAV) incluido como grupo externo (Valas *et al.*, 1997).

**Figura 19 A**

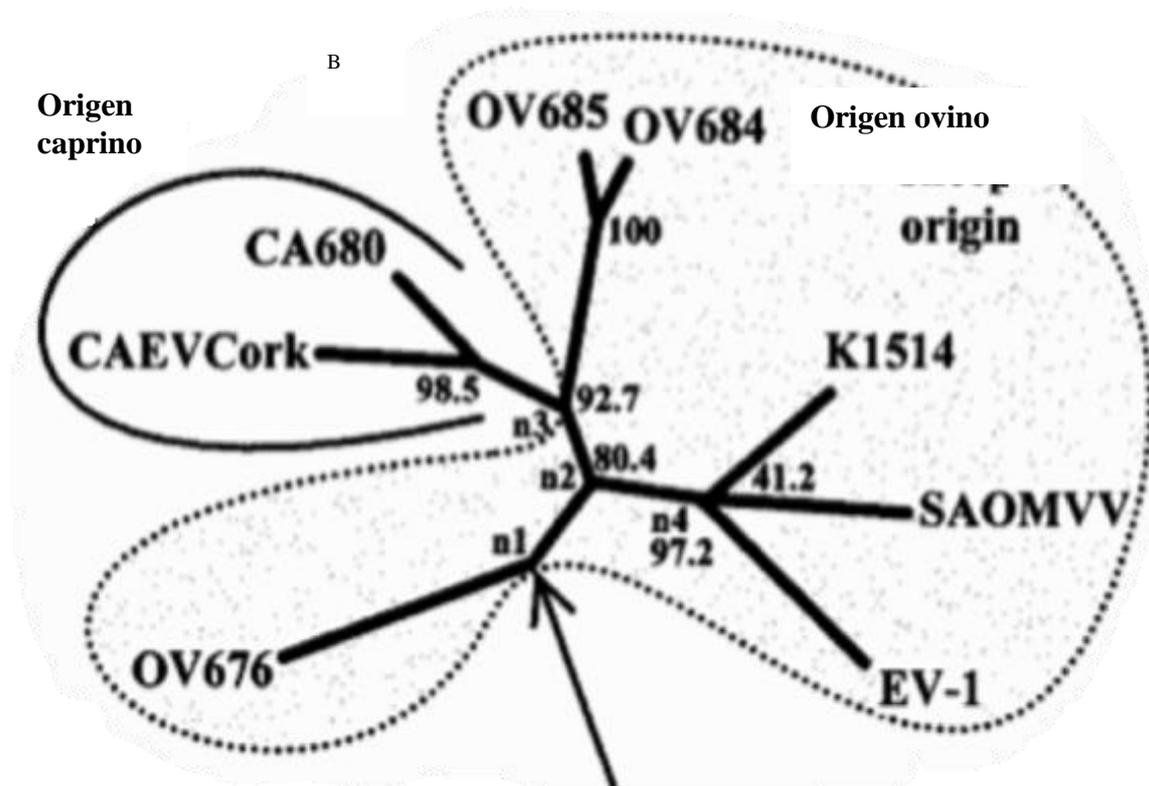
**Árbol filogenético de LVPR mostrando la relación entre un aislado caprino francés (CA680) y otros aislados caprinos y ovinos construido a partir de secuencias parciales de ADN del gen *gag* de CA**



Árbol que describe la relación filogenética del aislado lentiviral caprino francés (CA680) con los otros aislados caprinos. Muestra que el aislado caprino CA680 se agrupa con el aislado Cork en una misma rama la cual se relaciona de forma distante al grupo de MV que consiste de los aislados EV-1, SA-OMVV, ZZV1050, y K1514. En el árbol se muestra que las dos ramas principales divergen de la raíz derivada de la secuencia de CA de EIAV (Valas *et al.*, 1997).

**Figura 19 B**

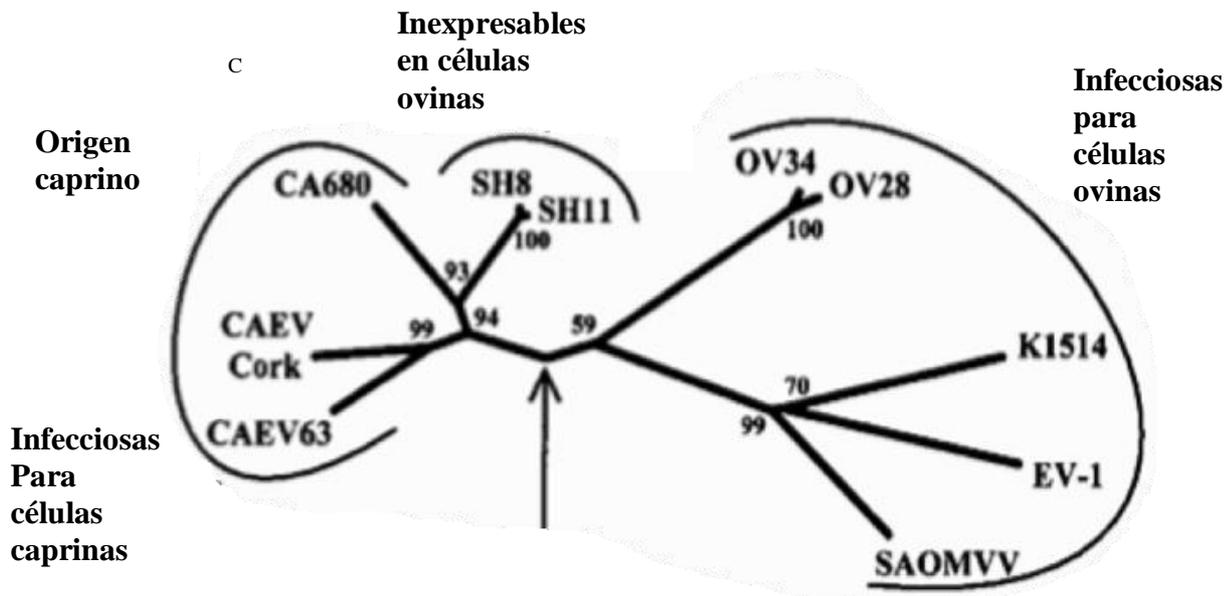
**Árbol filogenético de LVPR mostrando la relación entre un aislado caprino francés (CA680) y otros aislados caprinos y ovinos construido a partir de secuencias parciales de ADN del gen *pol RT***



En el árbol filogenético se muestra, primero la raíz EIAV (nodo 1 ó n1) entre dos ramas, una con el aislado OV676 y la otra con todos los otros LVPR, la segunda rama la cual está dividida en dos ramas (nodo 2 con un valor bootstrap de 80.4), una con los prototipos de MV, y la otra con dos subramas que incluye CA680 y CAEV CO, y la otra OV684 y OV685 (valor bootstrap de 92.7). Este árbol filogenético claramente muestra que el grupo originario de los LVPR de caprino está localizado en una rama opuesta a la raíz de EIAV. Esto indica que el surgimiento del grupo que contiene aislados caprinos conocidos ocurre en el nodo 3 simultáneamente con la aparición del grupo LVPR ovino OV684/OV685, pero después de dos empalmes sucesivos en los nodos 1 y 2 que llevan a la aparición de dos grupos (OV676 y K1514/SAOMVV/EV-1) que contienen exclusivamente LVPR ovinos (Valas *et al.*, 1997).

Figura 19 C

Árbol filogenético de LVPR mostrando la relación entre un aislado caprino francés (CA680) y otros aislados caprinos y ovinos construido a partir de secuencias parciales de ADN del gen *env* de SU



El árbol filogenético fue construido usando secuencias de *env* previas y secuencias de LVPR originadas a partir de ovejas. Estos últimos virus fueron LVPR infecciosos para las células de ovejas (prototipo VMV, OV28, y OV34) o SH8 y SH11. Estas últimas cepas originadas a partir de provirus inexpresables de dos ovejas americanas que son sospechosas de originarse a partir de infecciones abortivas con AEC, este árbol confirma que el grupo AEC incluyendo al aislado CA680 forma un grupo relacionado de forma distante a los prototipos de MV. Dos ramas separadas empezando por la raíz EIAV, una albergando prototipos de MV, OV28 y OV34, la otra albergando aislados de AEC, al Cork, 63, y CA680, y los LVPR inexpresables SH8 y SH11 (Valas *et al.*, 1997).

### **23.3.- Virus de AEC y MV: Especies distintas o quasiespecies, y sus implicaciones para diagnóstico de laboratorio**

El hecho de que los virus ARN en general, y los lentivirus en particular, existen como quasiespecies es atribuido al hecho de que el ARN polimerasa tiene un alto rango de error y un pobre mecanismo de corrección. El resultado es que los virus ARN se replican de manera imperfecta. El rango de error de la ARN polimerasa es directamente responsable de determinar el tamaño e integridad de las quasiespecies; bajos rangos de error de la ARN polimerasa están asociados con quasiespecies ocupando pequeños volúmenes de secuencia, mientras que grandes errores de esta resultan en quasiespecies ocupando largos espacios de volúmenes de secuencia (Pasick, 1998).

Esta variabilidad no es sólo un instrumento en la habilidad de los lentivirus para evadir la respuesta inmune del hospedero y producir infecciones persistentes, sino también les permite cruzar la barrera entre especies, como puede ser el caso de MV y AEC. Comienza a surgir la idea de que LVPR no es una colección de distintas especies, si no un grupo heterogéneo que poseen un grupo variable de hospederos así como capacidades patogénicas (Pasick, 1998).

Algunos experimentos, demuestran la evidencia de que los ovinos pueden ser infectados con AEC experimentalmente, así como los ovinos pueden ser infectados con AEC, esto soporta la teoría de una transmisión cruzada, aunque existe evidencia de que esto ocurre naturalmente. Se ha visto que la infección de cabras con los subtipos A3 o A4 está asociado con el contacto con ovejas, el cual está documentado, las cuales también tienen este mismo subtipo, lo cual indica la transmisión entre especies (Pasick, 1998; Shah *et al.*, 2004 (b)).

La información de las secuencias genómicas de los lentivirus de los pequeños rumiantes (LVPR) proporciona algunas pistas acerca de la relación del genotipo con el fenotipo (Pasick 1998).

En 1985, información sobre secuencias empezó a emerger sobre los genomas 9.2-kb de MV y AEC. La cepa K1514 de MV, aislado de la epidemia Islándica, fue la primera en tener su genoma enteramente secuenciado. Esto fue seguido por la información completa de la secuencia del nucleótido para el MV de Sudáfrica, la cadena CO de AEC y el aislado inglés de MV EV1, junto con archivos de secuencias parciales de otros aislamientos. Basados en información parcial de la secuencia del nucleótido para el gen *pol* y el dominio SU del gen *env*, los árboles genéticos fueron construidos ilustrando la relación genética entre un número de aislados de lentivirus de los pequeños rumiantes. Este análisis dio como resultado que los retrovirus de los pequeños rumiantes fueran divididos en cuatro grupos. Interessantemente, las tres cepas del MV K1514, SA-OMVV, y EV1, fueron puestos en el grupo IV (Pasick, 1998).

Dentro de ese grupo K1514 y SA-OMVV exhiben 81.5%, 87% y 80% de homología, deducido de las secuencias de aminoácidos de sus genes *gag*, *pol* y *env* respectivamente. Grados similares de homología existen entre K1514 y EV1 y entre EV1 y SA-OMVV. Por comparación, AEC CO y MV K1514, exhiben sólo 74.8 %, 77.5 %, y 60% de homología, su secuencia de aminoácidos en sus genes *gag*, *pol* y *env*. CAEV CO fue asignado al grupo genético II, el cual, hasta ahora, está comprendido de sólo otros dos aislados de LVPR de origen caprino, y para el cual sólo información de secuencias parciales del gen *pol* están disponibles. LVPR de los grupos genéticos I y III están originados a partir de cabras y ovejas. Sorprendentemente un análisis de los fragmentos 303 y 475 de los fragmentos nucleótidos del gen *pol* de LVPR franceses miembros del grupo genético I, los cuales se originaron a partir de ovejas, revelaron grandes similitudes más con CAEV CO que con MVV K1514 (Pasick, 1998).

La homología de las secuencias de aminoácidos de los miembros dentro de este grupo va de los rangos de 83% a 100% basado en los fragmentos del nucleotido 303 del gen *pol*. Cuando el grupo I de virus fue comparado con CAEV CO y MVV K1514, la homología de las secuencias de aminoácidos van de los rangos de 87% a 100% y de 83% a 88%, respectivamente (Pasick 1998).

Los LVPR han sido también separados en base a sus propiedades fenotípicas o biológicas. Las designaciones tipo I, o parecido a MV, y tipo II o parecido a AEC, han sido dadas a los virus que exhiben potenciales patogénicos específicos. Los virus tipo I tienden a ser altamente citopáticos *in vitro*, son patogénicos *in vivo*, e inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, mientras los virus tipo II tienden a producir infecciones persistentes y no líticas en los cultivos celulares, exhiben baja patogenicidad en animales infectados, e inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (Pasick, 1998).

Se ha descrito que aislados de lentivirus ovino 85/34 y 84/28, que son representativos los LVPR tipo I y II, tienen una homología del 97.5% en la secuencias de nucleotidos del gen *env* (Pasick, 1998).

Hay indicios que sugieren que los lentivirus ovinos franceses y norteamericanos tal vez se originaron de virus de AEC o virus parecidos a AEC (Pasick, 1998).

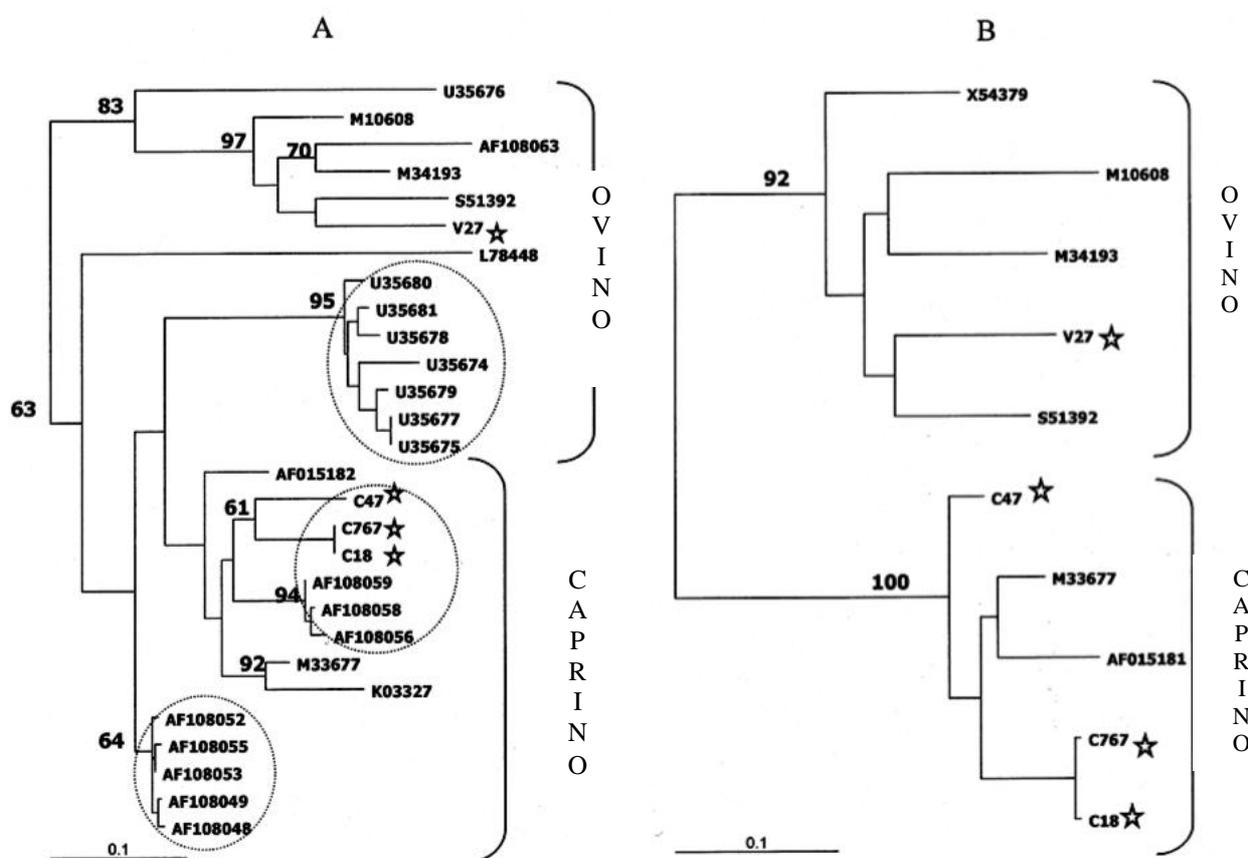
#### 23.4.- Análisis filogenético de LVPR del sur de Brasil

En este estudio se analizaron tres lentivirus aislados a partir de cabras del sur de Brasil, y el primer lentivirus aislado a partir de una oveja. Todos los animales presentaban artritis severa y fueron positivos a la prueba de inmunodifusión en gel de agar. Los virus C18, C47 y C767 fueron aislados a partir de explante de membrana sinovial. El lentivirus de oveja V27 fue aislado a partir de un explante de glándula mamaria, la oveja tenía siete años de edad, presentaba artritis, pérdida de peso progresiva, tos, descarga nasal y mastitis. Este virus en cultivo celular, resultó ser altamente citopático, que es característico de los virus de MV, en contraste a los virus de cabras (Ravazzolo *et al.*, 2001).

Los aislados caprinos (C18, C47 y C767) fueron agrupados con las de prototipos de AEC (20 A y 20 B) mientras que el aislado ovino V27 fue agrupado con los prototipos de lentivirus ovino, cuando se analizó el gen *pol* (figura A) o el gen *gag* (figura B) de las secuencias de nucleótidos. Las secuencias del virus V27 se agruparon con el aislado de Edimburgo (S51392) en el análisis del gen *pol* (figura A) y en el análisis del gen *gag* (figura B) (Ravazzolo *et al.*, 2001).

Figura 20

Árboles filogenéticos obtenidos a partir de secuencias *pol* (A) y *gag* (B) de LVPR

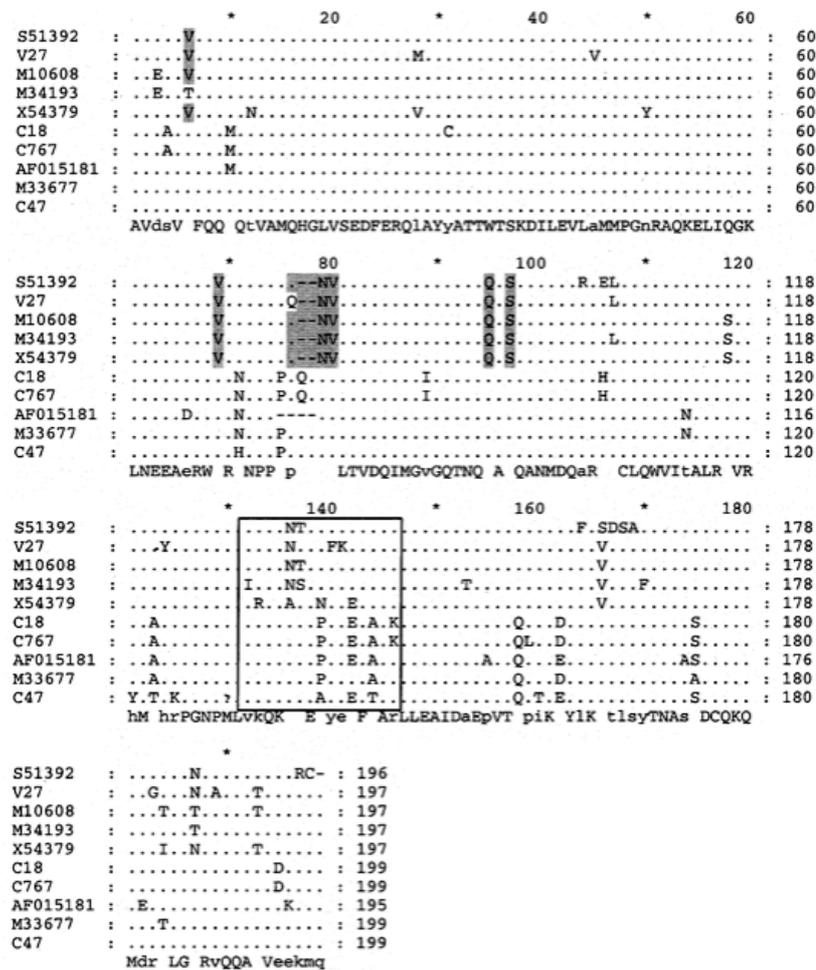


Árboles filogenéticos obtenidos para las secuencias de nucleótidos *pol* (A) y *gag* (B), por el método de máxima similitud. Los valores de bootstrap son de 100 (para *pol*) y 1000 (para *gag*) replicas indicando esto la confianza de las ramas, los valores de bootstrap están indicados en cada figura como porcentaje. Las estrellas indican los aislados brasileños y el número de acceso es usado para identificar las secuencias obtenidas a partir de las bases de datos. Los círculos punteados indican secuencias del mismo país que se agruparon juntas (Ravazzolo *et al.*, 2001).

Las secuencias de aminoácidos del gen *gag*, fueron analizadas para identificar dominios que pudieran permitir la diferenciación entre los lentivirus ovinos y caprinos. La región de mayor homología, una secuencia conservada entre los retrovirus, fue determinada con el alineamiento de aminoácidos de cápside de lentivirus caprinos, felinos y equinos (números de acceso P33458, NP\_040972 y AAG02702, respectivamente). La región de mayor homología corresponde a los aminoácidos 132-146 de la secuencia M33677 (encerrada en un recuadro en la figura 21) (Ravazzolo *et al.*, 2001).

Aunque las regiones de mayor homología están conservadas entre todos los aislados de lentivirus, incluyendo primates, las secuencias analizadas están menos conservadas de lo que se esperaba. La región encerrada en el recuadro muestra claras diferencias entre las cepas de MV y AEC. Esta región podría incluso indicar alguna especificidad de especie (Ravazzolo *et al.*, 2001).

**Figura 21**  
**Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen gag de LVPR**



El color gris indica residuos, sólo observados en los lentivirus ovinos. Los guiones indican deleciones y los puntos indican homología. La región de mayor homología de los lentivirus está encerrada en un recuadro. El consenso de secuencias de aminoácidos se muestra abajo del alineamiento de secuencias (Ravazzolo *et al.*, 2001).

Hubo una mayor diferencia entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas de cápside de AEC y MV que entre sus proteínas del gen *pol*. El fragmento *gag* de V27 tenía un 84% de similitud con los correspondientes fragmentos de MV y 78% con prototipos de AEC. En los fragmentos de *pol*, la similitud fue de 86 y 78% respectivamente (Ravazzolo *et al.*, 2001).

La similitud de secuencias aminoacídicas entre los lentivirus ovinos y caprinos fue mayor en la región terminal N, que en la Terminal C. Interesantemente, las regiones de mayor homología estuvieron menos conservadas que la región terminal N de la cápside, demostrando diferencias entre el origen de los LVPR ovinos y caprinos. Una diferencia particularmente sorprendente entre los prototípicos de MV y AEC fue detectada en las posiciones 69-97, comprende una delección de dos residuos (77 y 78 de M33677 en la figura 21) correspondiente a los aminoácidos 80 y 81 de la proteína de cápside de CAEV-Co tomada de la base de datos de SWISSPROT. Las cinco cepas de MV disponibles para análisis no tenían estos seis nucleótidos codificando estos dos aminoácidos ya mencionados, lo cual también se observó en las cepas de AEC. Cabe la posibilidad de usar estas dos delecciones de aminoácidos como característica de MV, para esto se está analizando los virus provenientes de hatos mixtos. Una comparación de esta región en el genoma de los lentivirus aislados a partir de ovejas y cabras que conviven en hatos mixtos, talvez de el camino para probar la posibilidad de la transmisión entre especies (Ravazzolo *et al.*, 2001).

### **23.5.- Análisis filogenético y la reclasificación de los LVPR basado en 104 nuevos aislados: Evidencia para regular la transmisión de oveja a cabra y la propagación mundial a través de comercio de animales**

Los primeros análisis filogenéticos, basados en secuencias cortas (*gag*, *pol*, *env*), había sugerido que los virus pudieran ser divididos en seis diferentes grupos de secuencias de I a VI. Recientemente se ha demostrado que los LVPR deben ser divididos en cuatro grupos de secuencias principales de A a D, los cuales difieren de 25% a 37% entre sus secuencias en las regiones *gag* y *pol*. El grupo A y B a su vez se dividen en subtipos que difieren entre si entre un 25%-27%. El grupo A contiene al menos siete subtipos de A1 a A7 y el grupo B contiene dos subtipos, B1 y B2. Hasta la fecha los subtipos A1 y A2 han sido sólo aislados de ovejas, y los subtipos A5, A7 y B1 y los grupos C y D han sido aislados sólo a partir de cabras. Los subtipos A3, A4, A6 y B2 han sido aislados tanto de ovejas como de cabras. En un estudio realizado con cabras y ovejas de Suiza, el grupo D y cuatro subtipos del grupo A: A3, A4, A5 y A7 están formados por nuevos aislados de origen suizo. La epidemiología molecular ha revelado que la cepa BI Suiza no difiere mucho de la francesa, brasileña o estadounidense, sugiriendo una propagación internacional debido a la importación y exportación de animales (Shah *et al.*, 2004 (b)).

**Cuadro 6**  
**Nueva clasificación propuesta para LVPR**

Designación del nuevo grupo propuesto	A							B		C	D
Propuesta de nuevo subtipo o designación de clado	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2		
Linaje en la actual nomenclatura	Grupo I	Grupo II	-	-	-	Grupo VI	-	Grupo V	Grupo IV	Grupo III	-
Comentarios y características	Virus parecido a MV tal vez necesite divisiones para formar más de un solo subtipo	Oveja procedente de Norte América	Virus aislados de cabras y ovejas de este estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus aislados de cabras y ovejas de este estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus único aislado de una cabra de este estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus aislados de cabras y ovejas en el sur de Francia	Virus único aislado de una cabra presente en este estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus parecidos a CAEV <sub>Cor</sub> aislados de cabras de todo el mundo	Virus aislados de cabras y ovejas en el sur de Francia y dos ovejas en el presente estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)	Virus aislado de cabras a partir de cabras en Noruega	Virus único aislado de una cabra del presente estudio (Shah <i>et al.</i> , 2004)

(Shah *et al.*, 2004 (b)).

En los árboles que se muestran en las figuras 22 A, 22 B y 22 C, se observa la relación filogenética de los lentivirus de ovejas y cabras, deducidas a partir de comparación de secuencias; en la secuencia *gag-pol* 1.8 kb (panel A), en la secuencia *pol* 1.2 kb (panel B) y el fragmento RT 279 contenido dentro de *gag-pol* (panel C). Los árboles sin raíz fueron construidos por el método *neighbor-joining*<sup>4</sup>. Epidemiológicamente las cepas de virus sin conexión del presente estudio, se muestran juntas con secuencias disponibles en las bases de datos. Secuencias individuales están marcadas con un número de cuatro dígitos si están derivadas de la presente investigación, mientras que las secuencias derivadas de las bases de datos están denotadas con su número de acceso al GenBank y un código de país (Br, Brasil; F, Francia; IL, Islandia; N, Noruega; SA, Sudáfrica; US, Estados Unidos). S31646 SA corresponde a SA-OMVV, M10608 IL a K1514, S51392 EV a EV1 y M33677 Co a CAEV<sub>Cork</sub>. Las ramas de los árboles están marcadas de acuerdo a la nueva clasificación propuesta basada en los grupos A-D y sus subtipos (números arábigos), donde es aplicable. Los números romanos I-VI en el panel C indican grupos de clasificación propuestas antes (Shah *et al.*, 2004 (b)).

#### 23.5.1.- Análisis filogenético del fragmento *gag-pol* 1.8 kb (figura 22 A)

Los árboles sin raíz de las secuencias mostradas a continuación, fueron construidas usando el método basado en distancia *neighbor-joining*. El análisis del fragmento *gag-pol* 1.8 kb junto con todos los archivos de secuencias disponibles, A y B (figura 22 A). El grupo A contiene aislados altamente discrepantes relacionados al prototipo del virus de MV, mientras que el grupo B es menos discrepante y contiene virus relacionados con el prototipo aislado CAEV<sub>Cork</sub>. La mayoría de las secuencias de este estudio, todas aisladas de diferentes hatos, agrupadas en la rama marcada B1 junto con CAEV<sub>Cork</sub> (marcado M33677 Co). Localizado en una rama separada fuera del origen del grupo B1, como es demostrado por el valor de *bootstrap* de 100, fueron dos aislados estrechamente relacionados de los cuales uno solo, identificado como 5720, es descrito que fue identificado a partir de dos ovejas del mismo hato. Esta rama está definida como B2 (Shah *et al.*, 2004 (b)).

---

<sup>4</sup> Es la unión de los OTU's (unidades Taxonomicas Operacionales) más cercanos (vecinos) tratando de minimizar la longitud total del árbol.

El grupo A altamente discrepante consiste en muchas ramas. La rama A1, separada de las demás ramas por un valor de *bootstrap* de 80, contiene tres aislados de referencia de MV SA-OMVV (marcado S31646 SA), K1514 (marcado M10608 Icl) y EV1 (marcado S51392 EV), los cuales están incluidos en el grupo I de la clasificación propuesta. Localizadas dentro del mismo grupo fueron puestas secuencias de ovejas recientemente establecidas, marcado 6247, en Suiza con síntomas típicos de visna (Shah *et al.*, 2004 (b)).

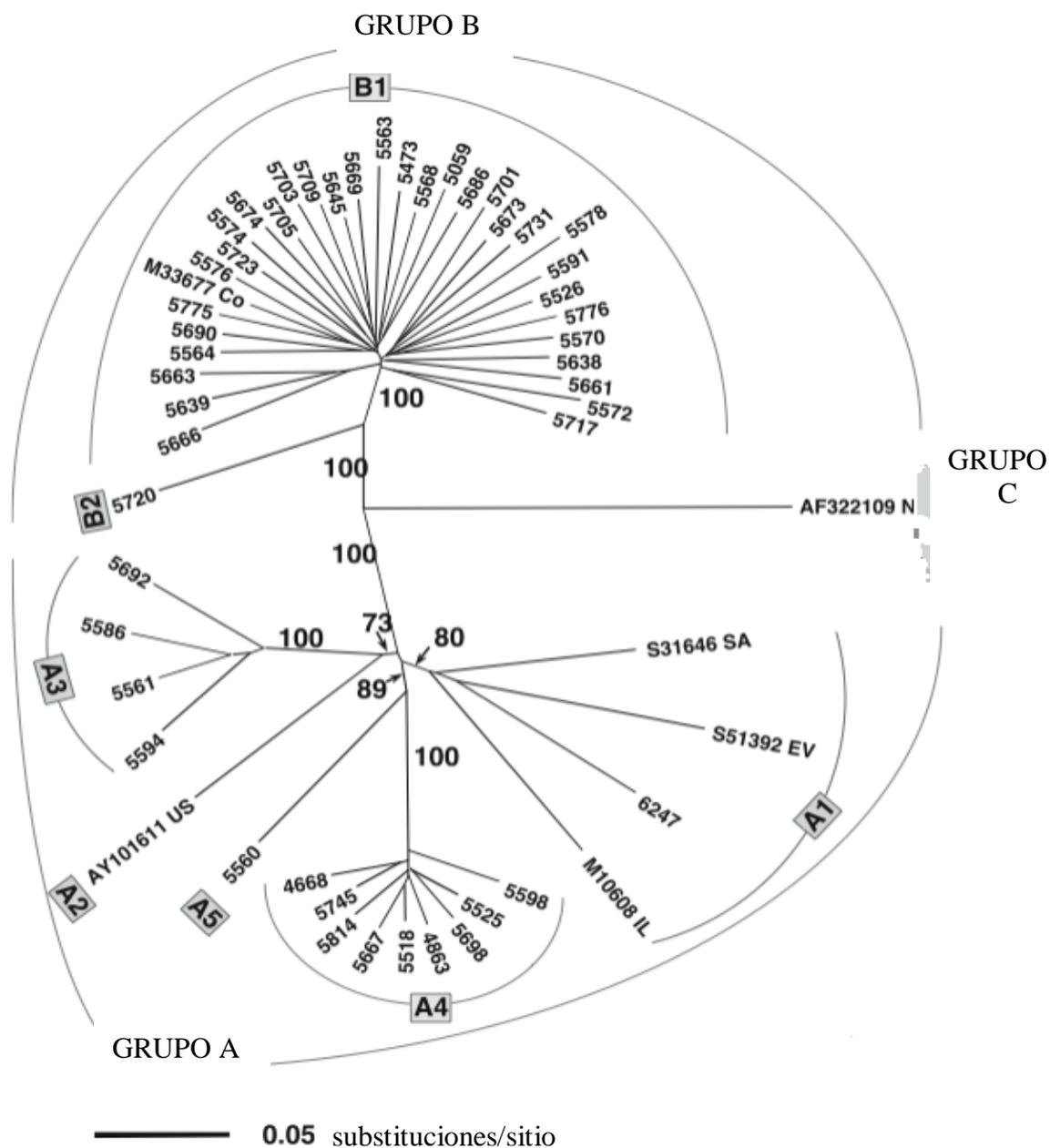
La secuencia AY101611 de una cepa de MV 85/34 proveniente de Norte América, la cual en la reciente clasificación pertenece al grupo II, formado por una rama separada designada acordemente como A2. La rama A3, se distingue de A2 por su valor *bootstrap* de 100, conteniendo un grupo de secuencias más relacionadas establecidas a partir de ovejas y cabras. La rama A4 contiene un compacto grupo de secuencias, que fueron también establecidas a partir de ovejas y cabras y están separadas de todas las otras secuencias por un valor *bootstrap* de 100. La rama A5 consiste en un simple aislado, 5560, el cual fue establecido a partir de una cabra. Ninguna de las secuencias en el grupo A revelaron evidencia de recombinación con aislados en cualquier otra rama cuando fueron investigados por la herramienta de genotipado del Centro Nacional para a Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). Por lo tanto, todas las nuevas ramas se considera que han sido el resultado de una evolución independiente (Shah *et al.*, 2004 (b)).

Ninguna secuencia fue encontrada con parecido a una sola, el aislado altamente discrepante (AF322109 N) establecido a partir de una cabra en Noruega que fue ramificada fuera, entre los grupo A y B, la cual en la actual clasificación pertenece al grupo III que es marcada aquí como grupo C (Shah *et al.*, 2004).

Los árboles fueron construidos usando métodos de parsimonia y parecido, también respaldando el orden de diferenciación y el ramificado de los grupos A, B y C , y de las ramas B1, B2, A3 y A4 mostradas en la figura 22 A, con valores *bootstrap* de 100. El tallo común de las ramas A2 y A3, las cuales tienen un valor *bootstrap* de 73 basado en la distancia del árbol, con valores alcanzados de 70 y 76 con métodos de parsimonia y similitud, respectivamente. Con un valor *bootstrap* de 63, la secuencia del grupo A1 fue menos respaldada por estos dos métodos de construcción de árboles (Shah *et al.*, 2004 (b)).

Figura 22 A

Árbol filogenético mostrando la relación entre LVPR a partir de secuencias de los genes *gag* y *pol* 1.8 kb



Los árboles sin raíz de las secuencias mostradas en la figura, fueron construidas usando el método basado en distancia *neighbor-joining*. El grupo A contiene aislados altamente discrepantes relacionados al prototipo del virus de MV, mientras que el grupo B es menos discrepante y contiene virus relacionados con el prototipo aislado CAEV<sub>Cork</sub>. Ninguna secuencia mostró recombinación con algunos de otras ramas, el aislado altamente discrepante (AF322109 N) establecido a partir de una cabra en Noruega fue ramificada fuera, entre los grupo A y B, la cual en la actual clasificación pertenece al grupo III que es marcada aquí como grupo C (Shah *et al.*, 2004 (b)).

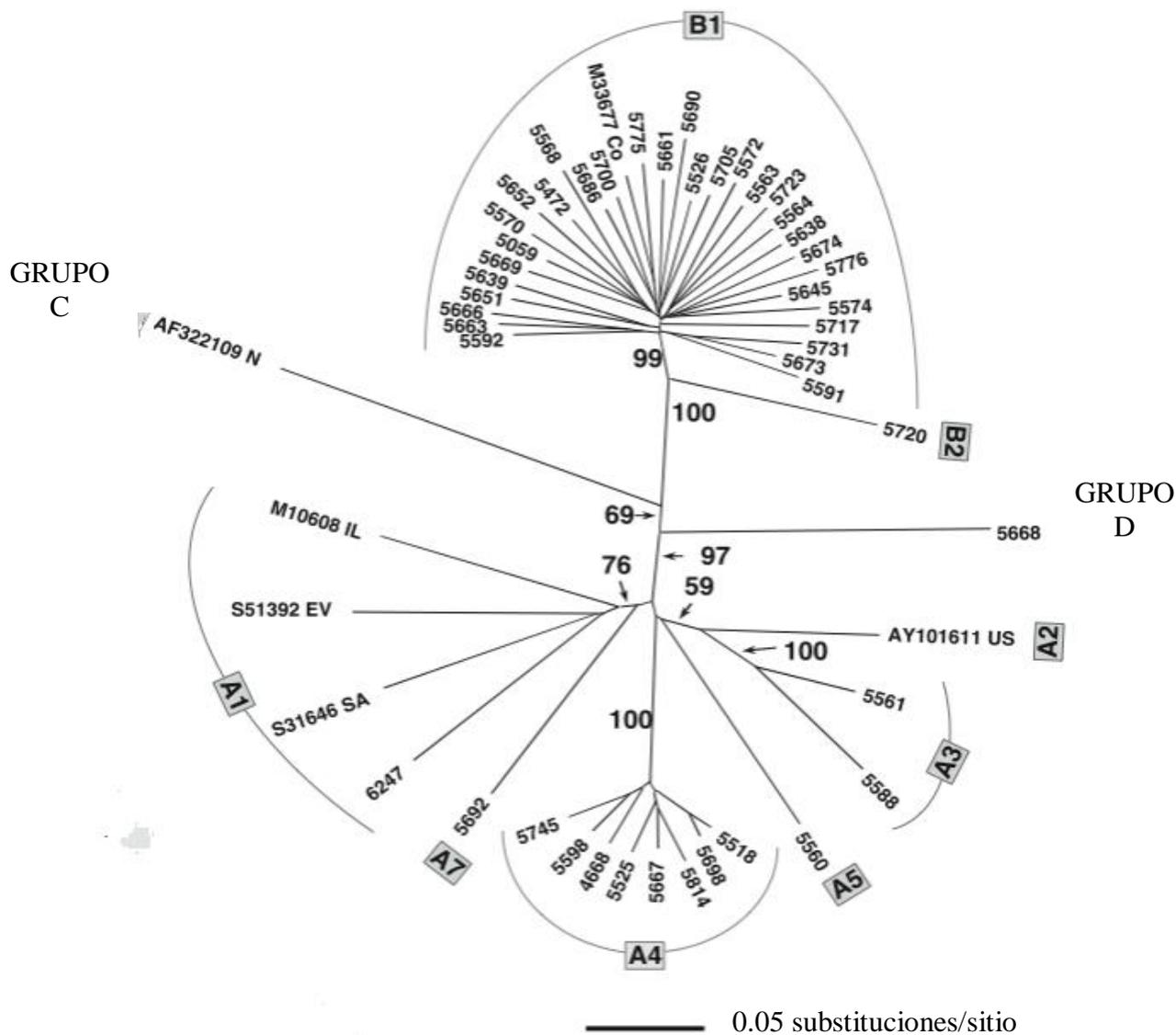
### 23.5.2.- Análisis filogenético del fragmento *pol* 1.2 kb (figura 22 B)

El análisis que fue hecho usando los mismos modelos y algoritmos, mostró que en general, todas las cepas para las cuales las secuencias *gag-pol* y *pol* estuvieron disponibles, fueron puestos dentro de los mismos grupos de secuencia o ramas. Con la excepción, de la secuencia amplificada tomada de la cabra 5692, en la cual las secuencias *gag-pol* fue puesta en la rama A3, ahora formando una rama separada, A7, la cual fue originada a partir del punto de la raíz similar a aquellos de otras ramas del grupo A, pero, con un valor de bootstrap de 76. Se distinguió de las secuencias que forman la rama A1. En el análisis de esta secuencia se utilizó la herramienta de genotipado del NCBI ha demostrado que la posición divergente de esta cepa en el árbol *pol* no resultó de la recombinación dentro de esta región (*gag-pol*) como los virus de otras ramas (Shah *et al.*, 2004 (b)).

Los grupos A y B, se encuentra lejos de la rama marcada como D que consiste en una rama simple, altamente divergente aislada a partir de una oveja, 5668, para la cual la amplificación en *gag-pol* continuó sin éxito a pesar de repetidos intentos utilizando alternativamente series de primers. La base de la rama de la cepa 5668 fue situada fuera de la raíz común al grupo A, lo cual fue confirmado por un valor bootstrap de 97%. La distinción del grupo C fue, con un valor bootstrap de 69, menos claro, pero valores bootstrap de 77 usando parsimonia y de 78 usando métodos de máxima similitud fueron confirmados en la cepa 5668 siendo distinto del grupo C (Shah *et al.*, 2004 (b)).

Figura 22 B

Árbol filogenético mostrando la relación entre LVPR a partir de secuencias del gen *pol* 1.2 kb



Para construir este árbol se usaron los mismos modelos y algoritmos, mostrando en general, todas las cepas para las cuales las secuencias *gag-pol* y *pol* estuvieron disponibles, fueron ubicadas dentro de los mismos grupos de secuencia o ramas. Con la excepción, de la secuencia amplificada obtenida de cabra 5692, en la cual en la secuencia *gag-pol* fue ubicada en la rama A3, ahora formando una rama separada, A7, la cual se originó a partir del punto de la raíz, similar a aquellos de otras ramas del grupo A, pero, con un valor bootstrap de 76. Entre los grupos A y B se encuentra una rama identificada como D, la cual es una rama simple altamente divergente aislada a partir de una oveja, 5668, para la cual la amplificación en *gag-pol* no tuvo éxito a pesar de repetidos intentos utilizando una serie de primers alternativos (Shah *et al.*, 2004 (b)).

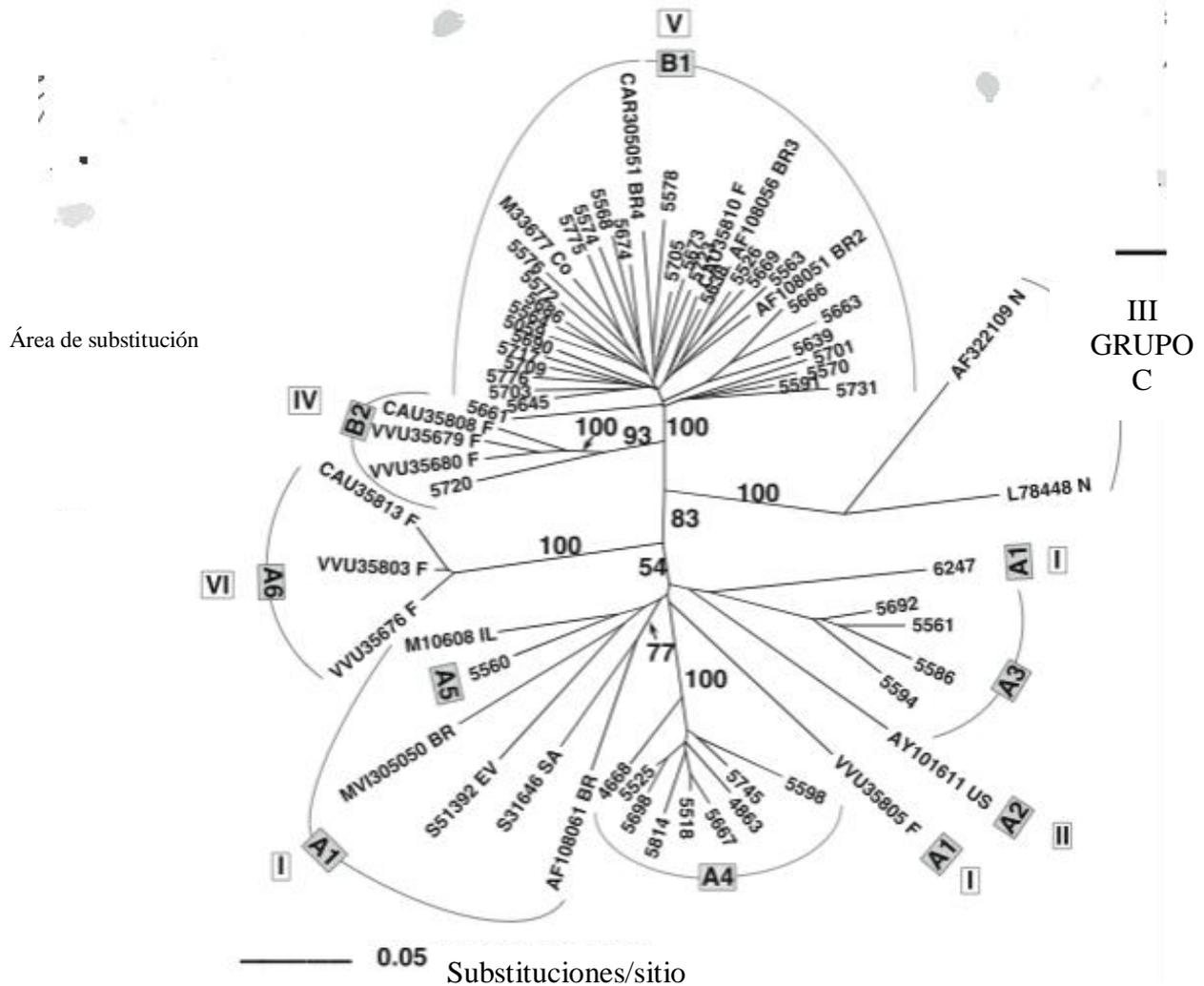
### 23.5.3.- Análisis filogenético de un fragmento RT 279 pb dentro de *gag-pol* (figura 22 C)

Para comprender la relación existente en estas nuevas secuencias obtenidas de aquellas previamente publicadas en trabajos filogenéticos, se analiza también un fragmento de 279 pb de la región RT que está incluido dentro del amplicon *gag-pol* 1.8 kb. Del total de las 137 secuencias disponibles, 82 de este estudio y 55 de las bases de datos, 68 fueron seleccionadas para análisis. La existencia de dos grandes grupos A y B fue confirmada. Entre estos se ubicaron los aislados noruegos del grupo C (grupo III de la clasificación actual), y los aislados del sur de Francia actualmente están clasificados como grupo VI. El valor de bootstrap por debajo de 54 no justifica una separación filogenética del grupo VI del grupo A; de este modo se representa otra rama principal del grupo A, la cual fue marcada como A6. La posición del aislado 5668, el cual sólo se logro amplificar en *pol*, en este árbol permanece abierto. Usando primers específicos derivados del grupo VI, la amplificación dio un resultado negativo, sugiriendo que el aislado 5668 clasificado en *pol* como grupo D, no pertenece a A6 (Shah *et al.*, 2004 (b)).

En el grupo B, la rama B1 incluye LVPR aislados de secuencias virales obtenidas de cabras del sur de Francia y Brasil las cuales fueron previamente clasificados dentro del grupo V. La rama B2 incluye secuencias recientes que habian sido ubicadas con virus del grupo IV que han sido aislados de cabras y ovejas del sur de Francia (Shah *et al.*, 2004 (b)).

Figura 22 C

Árbol filogenético mostrando la relación entre LVPR a partir de secuencias del fragmento RT 279



Para relacionar mejor estas nuevas secuencias de aquellas previamente publicadas en trabajos filogenéticos, se analizó también un fragmento de 279 pb de la región RT el cual está contenido dentro del amplicon *gag-pol* 1.8 kb. La existencia de dos grandes grupos A y B fue confirmada (Shah *et al.*, 2004 (b)).

#### 23.5.4.- Estatus de AEC en rebaños de cabras y su contacto con ovejas

Cuando las secuencias obtenidas de rebaños de cabras fueron analizadas, estos, que anteriormente habían sido registrados como libres de AEC, exhibieron una mayor frecuencia de infección con virus pertenecientes a la rama A4. Las cabras que tuvieron contacto documentado con ovejas fueron más frecuentemente infectadas con virus perteneciente a A3 o A4, esto quiere decir, que fueron virus que se encontraron igualmente en ovejas, mientras que aquellos rebaños sin documentación escrita de contacto, fueron más frecuentemente infectados con B1, encontrado sólo en cabras (Shah *et al.*, 2004 (b)).

#### 23.5.5.- Razas de las cabras

Cada una de las ramas B1, A4 y A3 estuvieron presentes en por lo menos cuatro razas diferentes de cabras. Secuencias virales de tres ramas estuvieron presentes en la misma proporción en dos razas mayoritarias, Chamoisée con 24 animales y Saanen con 17 animales. Sin embargo, hubo una débil pero significativa asociación entre las secuencias virales de una rama y la raza de cabras (Shah *et al.*, 2004 (b)).

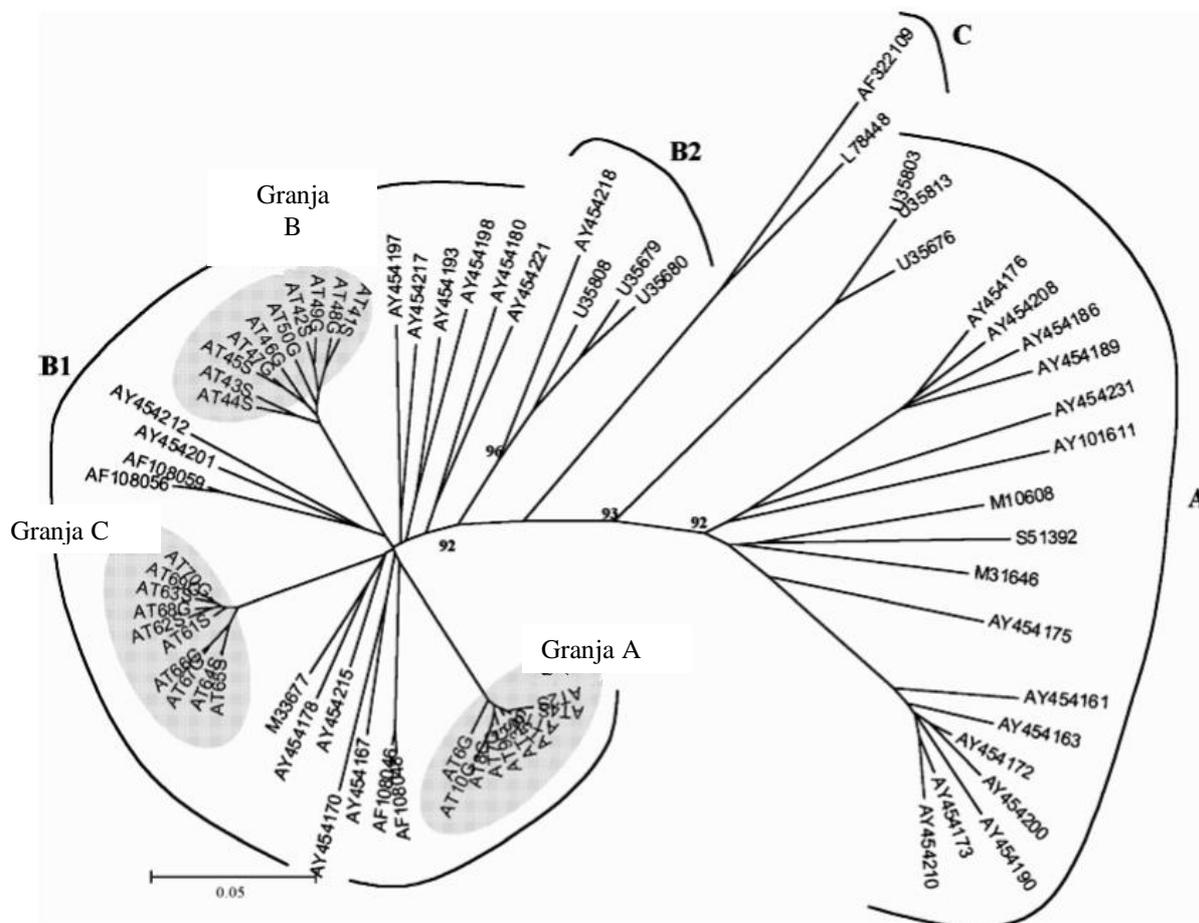
### **23.6.- Análisis filogenético del LVPR subtipo B1 en hatos mixtos: Evidencia de transmisión natural de cabras hacia ovejas**

Un análisis filogenético del LVPR subtipo B1, muestra que este cruza la barrera entre especies (aunque poco se sabe de la ruta de la transmisión entre especies), bajo condiciones de campo a través del contacto directo entre animales adultos. Esto lleva a pensar que los programas de control no deben estar basados sólo hacia las oveja o hacia las cabras, si no a ambas especies de forma conjunta (Pisoni *et al.*, 2005).

Se amplificó un segmento de 512 pb que comprende una porción de la secuencia del gen *pol* (el tercio proximal de RT) a partir de cinco cabras seropositivas y cinco ovejas seronegativas tomados de tres rebaños mixtos. El análisis de las secuencias *pol* demostraron que todos los provirus aislados de cabras y ovejas pertenecían al grupo B1 como se observa en la figura 23 (Pisoni *et al.*, 2005).

Figura 23

Árbol filogenético basado en el LVPR subtipo B1 de tres diferentes granjas de rebaños mixtos



La relación filogenética de los lentivirus de cabras y ovejas aisladas de los tres rebaños mixtos de Italia (A, B y C). Las secuencias del presente estudio están marcadas con las letras AT, representando la provincia de origen, un número para representar al animal, y la letra S para oveja (sheep) o G para cabra (goat) respectivamente. Tres ramas están marcadas de acuerdo a la clasificación basada en los grupo A, B y C (Pisoni *et al.*, 2005).

## 23.7.- Caracterización molecular y estudio filogenético de secuencias virales de MV y AEC de ovejas y cabra de España

Este estudio comprendió el análisis de tres regiones genómicas (*pol*, *gag-p25* y LTR), que fueron amplificadas y secuenciadas usando ADN de una oveja y dos cabras autóctonas de España. Las secuencias de los LVPR de las ovejas y cabras españolas fueron incluidos dentro de árboles filogenéticos con grupos de LVPR conocidos (Reina *et al.*, 2006).

### 23.7.1.- Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas y editadas con el programa BioEdit. El alineamiento múltiple para la comparación y estudios filogenéticos fueron hechos con el programa bioinformático Clustal X (Reina *et al.*, 2006).

### 23.7.2.- Secuencias conocidas de GenBank usadas en filogramas y estudios de conservación de aminoácidos

Las secuencias incluidas para generar los filogramas *gag* y *pol* fueron: EV1 (S51392), SA-OMVV (M31646) y KV1514 (M10608) como secuencias completas de LVPR de ovejas; las secuencias parciales de LVPR de ovejas y cabras de AY454233 a AY454287 (*pol*) y de AY454161 a AY454232 (*gag-p25*); y CAEV-Co (M33677) y CAEV1GA (AF322109) como secuencias completas de LVPR de cabras. Para el segmento *pol*-integrasa fueron incluidas secuencias de LVPR de ovejas españolas, Sp3 (AY044823) y Sp4 (AY044824). Para el segmento LTR fueron incluidas las secuencias derivadas de ovejas KV1772 (S55323) P1OLV (AF479638) y 85/34 USA (AY101611) además de las secuencias de virus completos usados en las comparaciones *gag* y *pol* (EV1, SA-OMVV, KV1514, CAEV-Co y CAEV1GA) (Reina *et al.*, 2006).

Las siguientes secuencias fueron usadas para ilustrar la conservación de los motivos de aminoácidos en los LVPR españoles comparados con secuencias lentivirales conocidas: en *pol*-dUTPasa y *pol*-integrasa, KV1514, SA-OMVV, EV1, CAEV-Co, CAEV1GA y la secuencia correspondiente a un virus de ungulado donde la dUTP-asa ampliamente estudiada (EIAV). Finalmente, para hacer un análisis comparativo de las región LTR, fueron usadas las secuencias EV1, SA-OMVV y KV1514 como secuencias completas de LVPR de ovejas y CAEV-Co y CAEV1GA como secuencias completas de LVPR de cabras (Reina *et al.*, 2006).

### 23.7.3.- Números de acceso para las secuencias de nucleótidos españoles

Las secuencias españolas definidas en el estudio han sido puestas en el GenBank con los siguientes números de acceso DQ632733, DQ632735 y DQ632735 para el segmento 1.2kb *pol*; DQ084349 a DQ084353 y DQ632733 para el segmento 219 nt *pol*-Integrasa; DQ084332 a DQ084344 para el segmento 592 nt *gag*-p25; y DQ084354 a DQ084360 y DQ334745 para el segmento 203-228 nt LTR (Reina *et al.*, 2006).

### 23.7.4.- Conservación de secuencias

Un alto nivel de conservación en la región dUTPasa fue encontrada entre los LVPR españoles estudiados (Ov1, C1, C3) y las secuencias de referencia (24 a y 24 b) (Reina *et al.*, 2006).



El alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos del gen *gag-p25* (figura 25) muestra que las secuencias de LVPR españolas tienen dos aminoácidos menos (glicinas G) en la posición 60 y 61 que el LVPR prototipo caprino CAEV-Co. Hay regiones altamente conservadas en la mayoría de las secuencias obtenidas de los LVPR ovino y parte de los caprinos. Estas fueron identificadas como un epítipo inmunodominante, responsable de la reacción cruzada de los anticuerpos contra la proteína p25 (cabe destacar que es una proteína importante en los kits de diagnóstico). La región de mayor homología, conservada entre los retrovirus, también lo fue en los LVPR españoles en el gen *gag-p25* (Reina *et al.*, 2006).

**Figura 25**  
**Alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen *gag-p25* de LVPR**

KV1514	LVSEDFERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQ	GKLNEEAERWVRQNP	NP	V	LTVDQIMGVGQTNQOASQANMDQARQICLQWVITALRS
SA-OMVV	.....	.....	.....	---	.....L.....
EV1	.....	.....	.....	---	.....R.EL.....A
CAEV-Co	.....	.....R.N..P..A	GG	GG	.....A.A.....N..A
CAEV1GA	.....E.....	.....R...QPA	G	GG	.....A.A.....I.G
Ov1	.....	.....	.....	---	.....L.....GA
Ov2	.....	.....	.....	---	.....L.....GA
Ov3	.....	.....	.....	---	.....L.....GA
Ov4	.....	.....	.....	---	.....L.....GA
Ov5	.....	.....	.....	---	.....L.....GA
Ov6	.....M.....	.....	.....	---	.....N.....
Ov7	.....	.....	.....	---	.....L.....GA
Ov8	.....	.....D.....	.....	---	.....S.....
C1	.....	.....	.....	---	.....L.....GA
C2	.....	.....D.....	.....	---	.....S.....
C3	.....M.....	.....	.....	---	.....A.....
C4	.....	.....D.....	.....	---	.....S.....
C5	.....	.....	.....	---	.....L.....GA
		<b>EPITOPE</b>		<b>GG</b>	
KV1514	VRHMSHRPGN	PMLVKQKNTESYEDFIARLLEA	IDAEPVTDPIKTYLKVTLSTYTNASTDCQKQMDRTLGT	VQQATVEEKMQACRDVGSEG	FKMQLLAQA
SA-OMVV	.....	.....I..S.....	.....T.....F.....	.....S.....	.....V.....
EV1	.....	.....	.....	.....S.....	.....V..N.....
CAEV-Co	.....	.....A.....TN.P..A.....	.....Q...D...L.....A.....	.....S.....	.....Q.....
CAEV1GA	.....	.....A.....R..PN.N..E.A.....	V.....Q...E.....NSE..H..V..Q.....	.....SI.....I.GTA	YQ.....
Ov1	.....	.....	.....	.....S.....	.....N.....R
Ov2	.....	.....	.....	.....S.....	.....V..N.....R
Ov3	.....	.....S.....	.....	.....S.....	.....V..N.....R
Ov4	.....	.....	.....	.....S.....	.....V..N.....R
Ov5	.....	.....	.....	.....S.....	.....V..N.....R
Ov6	.....	.....S..E.....	.....	.....S.....	.....V..N.....R
Ov7	.....	.....	.....	.....S.....	.....N.....R
Ov8	.....	.....I..S.....	.....A.....	.....S.....	.....V..N.....R
C1	.....	.....	.....	.....S.....	.....V..N.....R
C2	.....	.....I..S.....	.....A.....	.....S.....	.....V..N.....R
C3	.....	.....T.R..N..E.V.....	.....A.....	.....S.....	.....V..N.....R
C4	.....	.....I..S.....	.....A.....	.....S.....	.....V..N.....R
C5	.....	.....	.....	.....S.....	.....V..N.....R
		<b>MHR</b>		<b>EPITOPE</b>	

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de LVPR del gen *gag-p25* de ovejas (8) y cabras (5), y de secuencias de LVPR de ovejas y cabras disponibles en GenBank (KV1514, SA-OMVV, EV1, CAEV-Co, CAEV1GA). Las dos glicinas adicionales presentes en CAEV-Co, la región de mayor homología (MHR) y los dos epítopes inmunodominantes de esta proteína de cápside están dentro de cuadrados. (.) significa homología y (-) deleción (Reina *et al.*, 2006).

El alineamiento de secuencias nucleotídicas de la región LTR que muestra alta heterogeneidad genómica en las regiones LTR analizadas (figura 26). Sin embargo, las secuencias correspondientes a los motivos que activan la transcripción (AP-1 y AP-4) recuadro TATA y la señal de poliadenilación fueron secuencias altamente conservadas entre los LVPR españoles, así como entre prototipos conocidos como EV1, SA-OMVV, KV1514, CAEV-Co y CAEV1GA (Reina *et al.*, 2006).

**Figura 26**

**Alineamiento de secuencias de la LTR de LVPR**

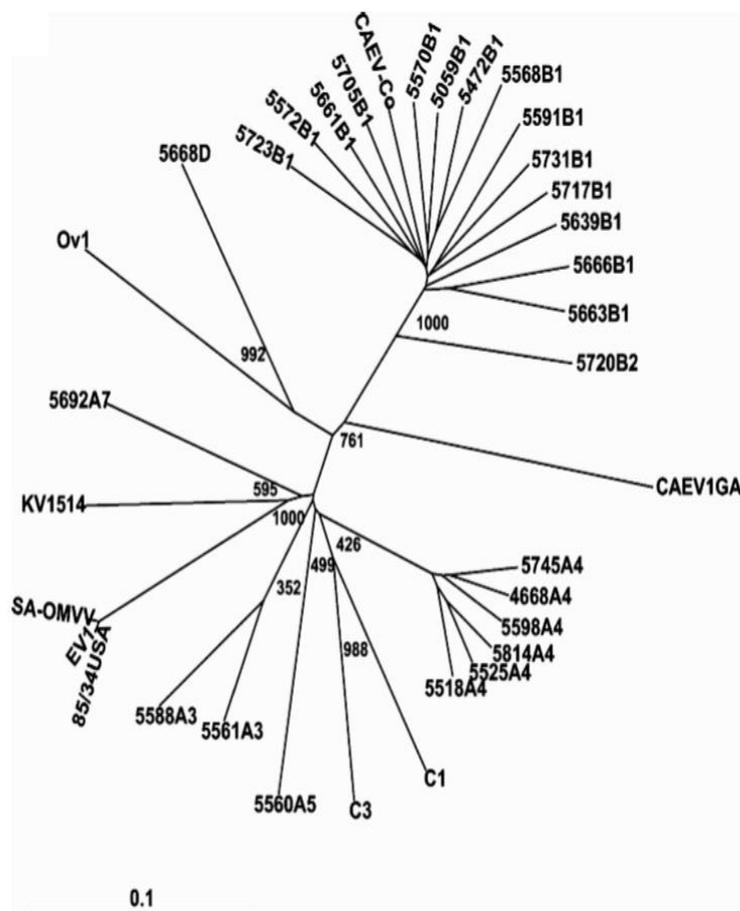
CAEV-Co	AGCTGA	CATA	TCAGCTGATG	TT-GCTC	ATGCTGACAC-TGTAGTCTGAGCTG	TATATAA	GGA-GAAGCTTGCTGCTTGCACT-----
CAEV1GA	.....	TGCC	.....	.....	.....A.....A..AG.....C	.....	AC.GAGCC..AGAGCT.GCT.....
KV1514	.A....	TG..	G.....	..GAG..	..AACC..GA...AACAA.TTGCC	.....	.CCGCTT...A...GGGAA.AG-----
EV1	.A....	TG..	.....	..AAG..	..AACC..AT...AACAA..CTGCC	.....	.CTGCTT...C...G...AG-G-----
SA-OMVV	.AA.C.	TG..	.....	..A.G..	..AACC..AT...AACAA.TTGCC	.....	.CTGCTT...A...GGA.AGA-----
C1	.A....	TG..	G.....	..AAG..	..AACC..AA...AACAACTGCC	.....	.CT-CCT...TA.TCA.A-AG-----
C3	.A....	TG..	.....	..A.A..	..AACC..GA...AACAACTGCC	.....	ACC-CCT...TAATGA.A-AG-----
C4	.A....	TG..	.....	..A.G..	..AACC..AA...AACAACTGCC	.....	.CT-CCT...TCA...GGG-----
Ov1	TA....	TG..	G.....	..A.G..	..AACC..AT...AACAACTGCC	.....	.CTGCTT.A.A...TGA..TAG-----
Ov5	TA....	TG..	G.....	..A.G..	..AACC..AG...AACAACTGCC	.....	.CT-CCT...A.T.A.A.G-----
Ov8	.A....	TG..	.....	..A.G..	..AACC..AC..G.AACAA..CTGCC	.....	.CT-CCT...A.T.A.GGAG-----
Ov9	.A....	TG..	G.....	..A.A..	..AACC..AA...AACAA..CTGCC	.....	.CT-CCT...A.TAA.G.AGGCAGAGTTCTC
Ov11	.A....	TG..	.....	..A.G..	..AACC..AC...AACAAAC.GCC	.....	.CT-CCT...GCTGA.AGAG-----
		AP-1	AP-4	AP-1		TATA box	
CAEV-Co	TCAGAGT-TCTAGGAGA-----			GTCCCTCCTAGTCTCTCCTCTCCGAGGAGGTACCGAGACCTCAA		AATAAA	GGAGTGATTGCCT---TACT
CAEV1GA	.....GCTCT.AG..GCTCG--AAGGAAAGAGTC.TC..C.....			.....C--TTCG..CT.AT--		.....	.....GC...T.CAAC.GA
KV1514	C-.....GCT.T...GCTCG-AAGGAAA.AGT...GG.C.....			GC.T.CC-----TGA.A.G.---		.....	.....G...-G.TA
EV1	C-.....GCT.G...G-----AAC..TC...G.C.....			GCTT.CA-----T.GAGAG.T-		.....	.....GCTGTAGGT.
SA-OMVV	.....CACTCTT.G..GT-----GGAAG.TC..RG.....			GC.T.-A-----T.T.GAGA..		.....	.....A.T.....A
C1	.....C...T...TCCCCT-GAGAAAG.GAT..T.AGAG.....			GC.T.T-----T.GA..T.--		.....	.....A...-G.GG
C3	G.....C...T...AGAGAT...AGAG.....			GC.T.T-----T.GAG.T.--		.....	.....A...-G.GA
C4	--.....C.T.C...TCTCCT--TGAGAGAGAT..T.GGAG.....			GC.T.T-----T.GA..T.--		.....	.....A...-G.GG
Ov1	C.....C...GA...G-----AGAA...AGAG.....			GC.T.T-----T.GAT--		.....	.....A...-G.GA
Ov5	.....C...C...GAGAT...AG.G.....			GC.T.T-----T.GACA.A--		.....	.....A...-G.GA
Ov8	.....C...T...GAGAT...GGAG.....			GC.T.TA-----T.G-		.....	.....A...-G.AA
Ov9	.....T...C...TCTCTTAGAGGACG.GAG...GGGAG.....			GC.T.C-----T.AGG.--		.....	.....A...-G.GA
Ov11	.....CC..T..G-----AA.GAT.CT.AG.G.....			GC.T.T-----T.GA..GA--			.....A.A--G.GA
						Poly A site	
CAEV-Co	GCCGAGTGGAGAGTGATTACTGAGCGGCCGGTGTATCGGGAGTCTCCCTTAATCT-GTGCAA						
CAEV1GA	A.T...CT.GTC...G...T-----GAC..A---AGTC.C-----						
KV1514	T.T...CTTGCC-.G...T-----T...TA.....C.....						
EV1	..T...CT.GTC-.G..TT-----T...TC..TA.-.....C.....						
SA-OMVV	A.T.C.CTAGCC-.G...T-----T...A-----						
C1	A.T...CTTGCC-.G...T-----C...GCC..TA.-.....C.....						
C3	..T...CTAGCC-.G...T-----C...TA-----C.....						
C4	A.T...CT.GCC-.G...T-----TC...TA.-.....C.....						
Ov1	..T..ACTAGCC-.G..GT-----TC..TA.-.....C.....						
Ov5	A.T...CTTGCC-.G...T-----C...TA-----C.....						
Ov8	A.T...CTAGCC-.G...T-----T...TA.-.....C.....						
Ov9	A.T...CTTGCC-.G...T-----TC..TA.-.....C.....						
Ov11	T.T...CT.GCC-.G...T-----C...TA.-.....C.....						

Alineamiento de secuencias nucleotídicas de la región LTR de LVPR analizadas, correspondiente a diferentes ovejas (5) y cabras (3); y secuencias de LVPR de ovejas (EV1, SA-OMVV, KV1514) y de cabras (CAEV-Co y CAEV1GA) obtenidas de GenBank. (.) Significa homología y (-) deleción (Reina *et al.*, 2006).

### 23.7.5.- Análisis filogenético

El filograma de la secuencia de nucleótidos *pol* de la región 1130 de kb (figura 27 A) muestra, que de acuerdo con la clasificación propuesta por Shah , las tres secuencias virales de LVPR españolas que se estudiaron corresponden a los grupos A y D. Estas no fueron asignadas a los grupos A y B que incluyen a los prototipos de caprinos LVPR CAEV-Co y CAEV1GA. Específicamente, C1 y C3 se encontraron más cerca a la secuencia de LVPR conocida 5560 del subgrupo A5 (5560A5), y al grupo mixto de ovejas y cabras A3 y A4. Ov1 pertenece al grupo D junto con la secuencia de LVPR de oveja 5668 (5668D) (Reina *et al.*, 2006).

**Figura 27 A**  
**Árbol filogenético de secuencias del segmento *pol* 1.2 kb de LVPR**

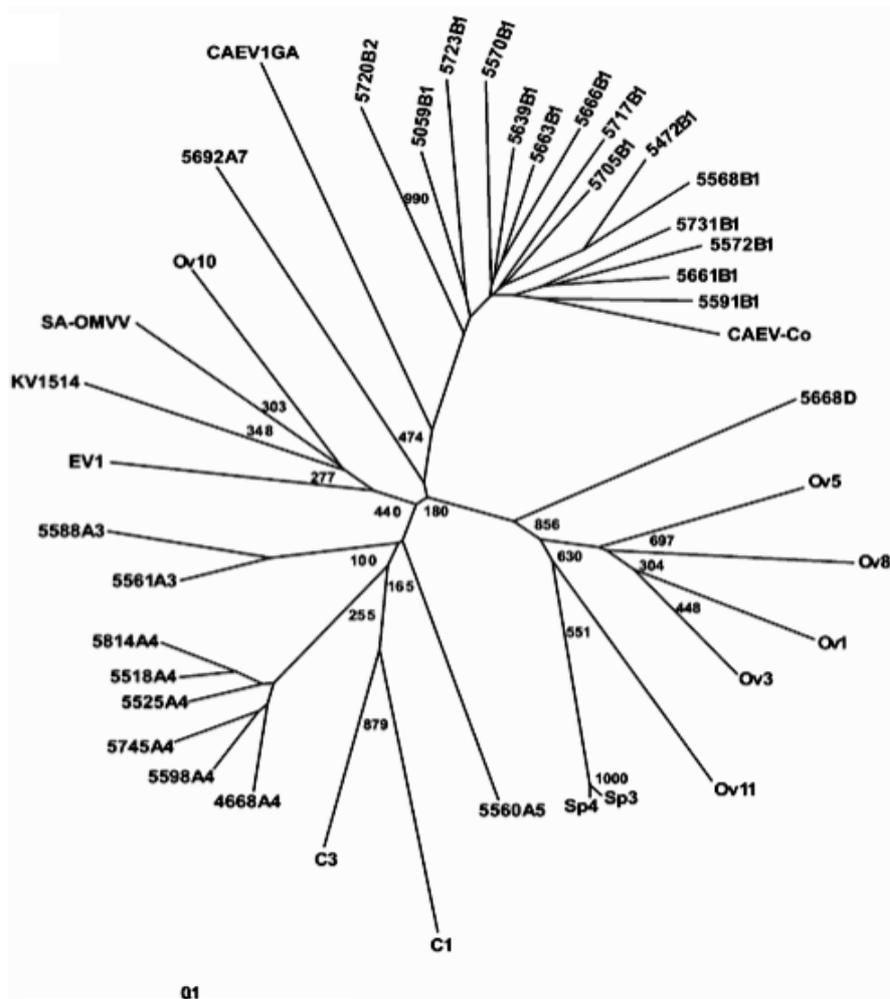


Filogramas nucleotídicos indicando la distribución de secuencias obtenidas de cabras y ovejas españolas y de las secuencias obtenidas de GenBank que incluyen los grupos filogenéticos para la región genómica bajo estudio (Reina *et al.*, 2006).

El filograma de la región *pol*-Integrasa (figura 27 B), que incluye una secuencia respectiva del grupo D del gen *pol*, reveló que las secuencias ovinas españolas (Sp3 y Sp4) estaban muy cerca de los LVPR ovinos Ov1, Ov3, Ov5, Ov8 y Ov11, pertenecientes al grupo D. Los LVPR ovinos y caprinos estuvieron fenotípicamente distantes de los prototipos de CAEV CAEV-Co y CAEV1GA. Una de las secuencias de LVPR ovino estudiadas (Ov10) fue asignada al grupo A1, lo que la ubicó a los prototipos de LVPR ovinos SA-OMVV, KV1514, EV1. Las topologías de los dos árboles (correspondientes a las secuencias de nucleótidos *pol* 1130 y a las secuencias de nucleótidos 210 *pol*-Integrasa) fueron compatible una con la otra (figura 27a y 27b) (Reina *et al.*, 2006).

**Figura 27 B**

**Árbol filogenético de secuencias del segmento *pol*-integrasa de LVPR**

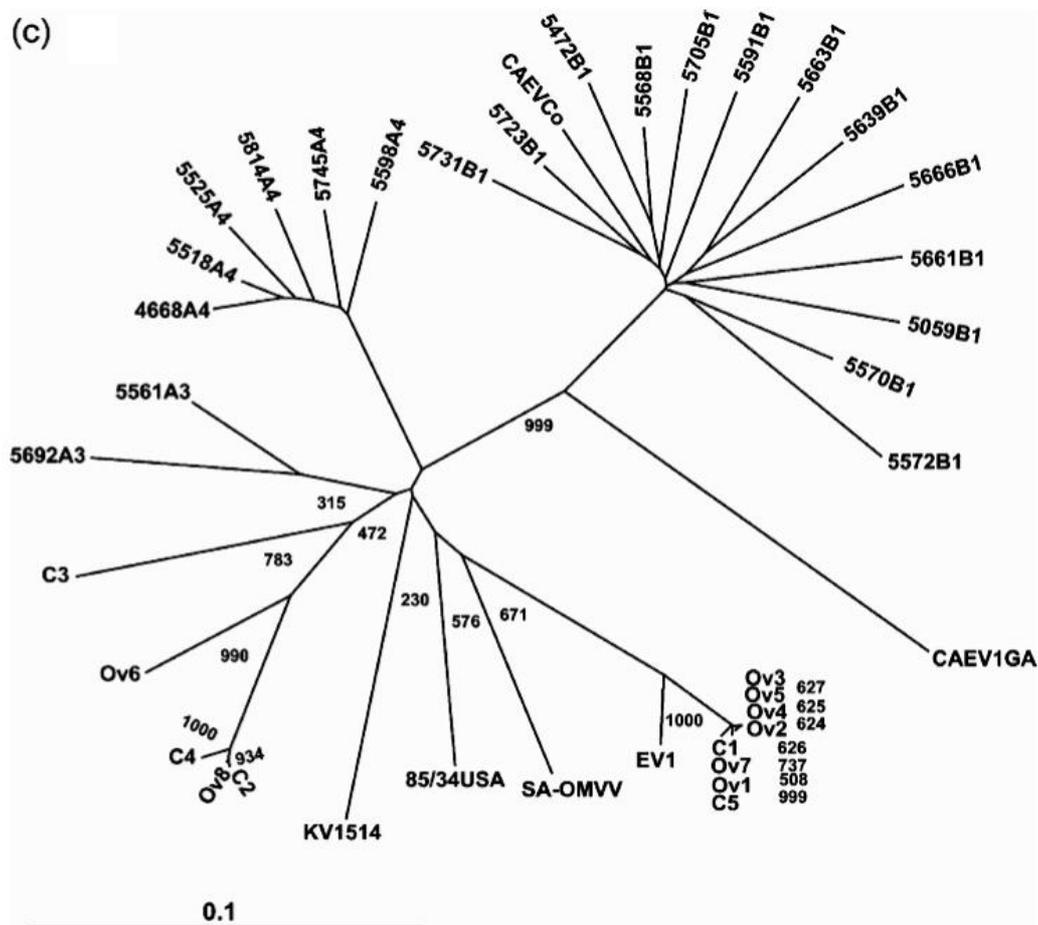


Filogramas nucleotídico indicando la distribución de secuencias obtenidas de cabras y ovejas españolas y de las secuencias obtenidas de GenBank que incluyen grupos filogenéticos para las regiones genómicas bajo estudio (Reina *et al.*, 2006).

El filograma de referencia correspondiente al gen *gag-p25* (figura 27 C) incluye a los grupos A (A1, A3, A4), B1 y C, y no al grupo D. El filograma muestra que las tres secuencias estudiadas (Ov1, C1, C3) y las secuencias adicionales estudiadas pertenecientes al grupo A (A3: Ov6, Ov8, C2, C3, C4; A1: Ov1, Ov2, Ov3, Ov4, Ov5, Ov7, C1, C5) no pertenecen a los grupos B o C (figura 27C). El grupo de la tres secuencias de nucleótidos del gen *pol* (Ov1, C1 y C3) y otras secuencias españolas de este (Ov3, Ov5, Ov8, Ov11) y trabajos previos (Sp3 y Sp4) están dentro de los grupos A o D se observó usando más regiones de restricción del gen *pol* (figura 27 C) (Reina *et al.*, 2006).

**Figura 27 C**

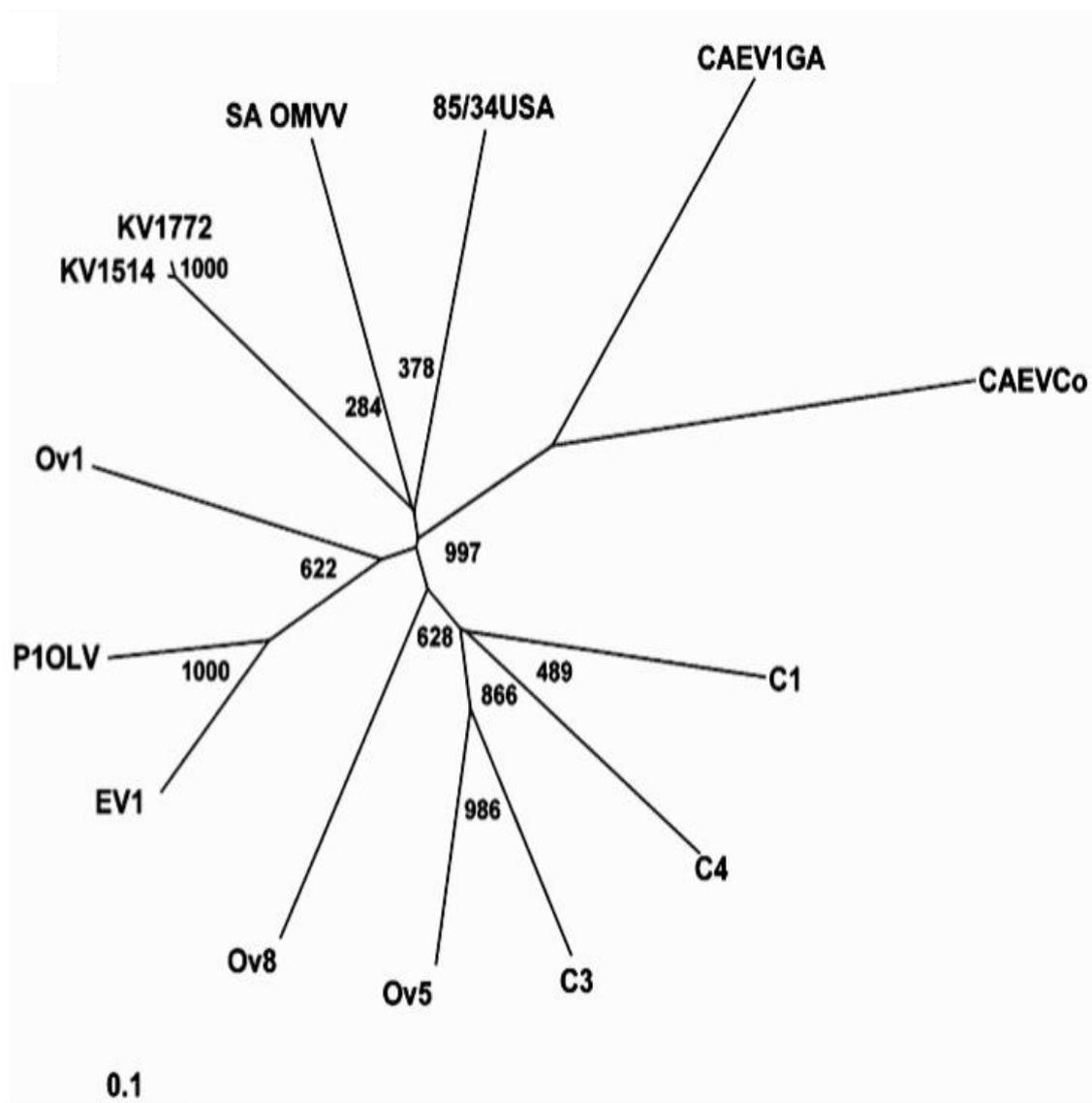
**Árbol filogenético de secuencias del segmento *gag-p25* de LVPR**



Filogramas nucleotídicos indicando la distribución de secuencias obtenidas de cabras y ovejas españolas y de las secuencias obtenidas de GenBank que incluyen los grupos filogenéticos para las regiones genómicas bajo estudio (Reina *et al.*, 2006).

Los filogramas para la región LTR (figura 27 D), muestra que las tres secuencias que se estudiaron (Ov1, C1, C3) y las secuencias de LVPR obtenida de ovejas (Ov5 y Ov8) y de cabras (C4) pertenecen al grupo A-D (no B, no C). Ambas secuencias (CAEV1GA) y B1 (CAEV-Co) de cabras, tienen una raíz común, distinta de cualquier secuencia involucrada en este estudio (Reina *et al.*, 2006).

**Figura 27 D**  
**Árbol filogenético de secuencias del segmento LTR de LVPR**



Filogramas nucleotídico indicando la distribución de secuencias obtenidas de cabras y ovejas españolas y de las secuencias obtenidas de GenBank que incluyen los grupos filogenéticos para la región genómica bajo estudio (Reina *et al.*, 2006).

Los filogramas construidos con secuencias de nucleótidos y aminoácidos (en los genes *pol* y *gag-p25*) tienen una topología similar. En conjunto muestran que las secuencias de los LVPR españoles están más cerca de los prototipos conocidos de LVPR de ovejas, como EV1, KV1514 y SA-OMVV, que de los prototipos conocidos de LVPR de cabras, como son CAEV-Co y CAEV1GA (Reina *et al.*, 2006).

En el cuadro 7 se muestra un resumen de la substitución de nucleótidos en las regiones estudiadas entre las secuencias españolas.

**Cuadro 7**

**Resumen de la sustitución de nucleótidos en las regiones estudiadas entre las secuencias españolas**

Nucleótido Original	Sustituido por				
	A	C	G	T	-
(a)					
A		2.30	4.65	1.53	0.03
C	0.15		0.68	2.09	0.06
G	0.62	0		0.50	0
T	0.15	0.62	0.09		0.03
-	0	0	0	0	
(b)					
A		0.39	2.25	0.54	0.70
C	0.16		0.39	1.32	1.09
G	0.78	0		0.54	0.85
T	0.08	0.62	0.31		0.70
-	0.31	0.23	0.16	0.23	
(c)					
A		8.22	36.99	10.5	0
C	1.37		3.65	18.26	0
G	13.70	0.91		3.65	0
T	5.94	7.31	2.28		0
-	0	0	0	0	
(d)					
A		0.36	1.24	0.20	0
C	0.06		0.03	0.49	0
G	0.38	0		0.13	0
T	0.35	0.20	0.05		0
-	0	0	0	0	

Frecuencia de sustitución de nucleótidos (expresado como porcentaje de total de sustituciones para ese nucleótido en particular) observado en las regiones del genoma viral estudiado: (a) *pol* 1.2 kb; (b) LTR; (c) *pol*-Integrasa; y (d) *gag*-p25 (Reina *et al.*, 2006).

En los segmentos *pol* 1.2 kb, *pol*-Integrasa y el gen *gag*-p25, la similitud de aminoácidos fue siempre más alta que la similitud de nucleótidos. Indicando que la relación filogenética entre las secuencias de LVPR españolas estudiadas a partir de ovinos y caprinos; las secuencias españolas estuvieron más cerca de secuencias prototipo de LVPR ovinos como EV1, SA-OMVV y KV1514 que a las secuencias de prototipos de LVPR caprinos, como CAEV-Co y CAEV1GA. Esto confirma que la proximidad genética de los LVPR puede ser independiente de la especie hospedera (Reina *et al.*, 2006).

### **23.8.- Análisis filogenético de la región *gag* que codifica la proteína de matriz de LVPR: Análisis comparativo y de aplicaciones epidemiológicas moleculares**

Pequeñas secuencias de información están en la proteína matriz, codificando regiones de los LVPR. Cincuenta y dos secuencias fueron obtenidas, y permitieron el primer análisis filogenético de la región *gag* en el genoma de los LVPR (Pisoni *et al.*, 2006).

Un análisis epidemiológico molecular basado en estas secuencias indicó que las cepas de lentivirus italianos están estrechamente relacionadas entre ellas y con la cepa CAEV-CO, una cepa prototipo aislada hace tres décadas en E.U.A. Esto sugiere un origen común de los LVPR circulando en los hatos monitoreados, posiblemente relacionado a la introducción de cabras infectadas en una población seronegativa (Pisoni *et al.*, 2006).

Se han encontrado con virus pertenecientes al subtipo B2 (de la clasificación propuesta por Shah *et al.*, 2004a) aislados de poblaciones de ovejas naturalmente infectadas en Europa, están estrechamente relacionados a AEC que a MV, esto es sugerido por el análisis hecho a varias de las secuencias de nucleótidos parciales en sus genes. Este resultado tal vez indicaría un virus ancestral parecido al de AEC presente en las ovejas y que ha sido recientemente esparcido en poblaciones de cabras. La transmisión entre especies ocurre esporádicamente y se ha demostrado por la detección de subtipos particulares de LVPR tanto en cabras como en ovejas (Pisoni *et al.*, 2006).

Realizaron un alineamiento de cincuenta y dos secuencias de aminoácidos del gen *gag*, con el programa ClustalW. Secuencias de Genbank/EMBL fueron incluidas en el alineamiento: M33677 (CAEV-CO); AY265456 (It-Pi1); AY265455 (It-561); S51392 (EV1); M60609 (K1514); M31646 (SA-OMVV); AF479638 (P1OLV); AY445885 (Pisoni *et al.*, 2006).

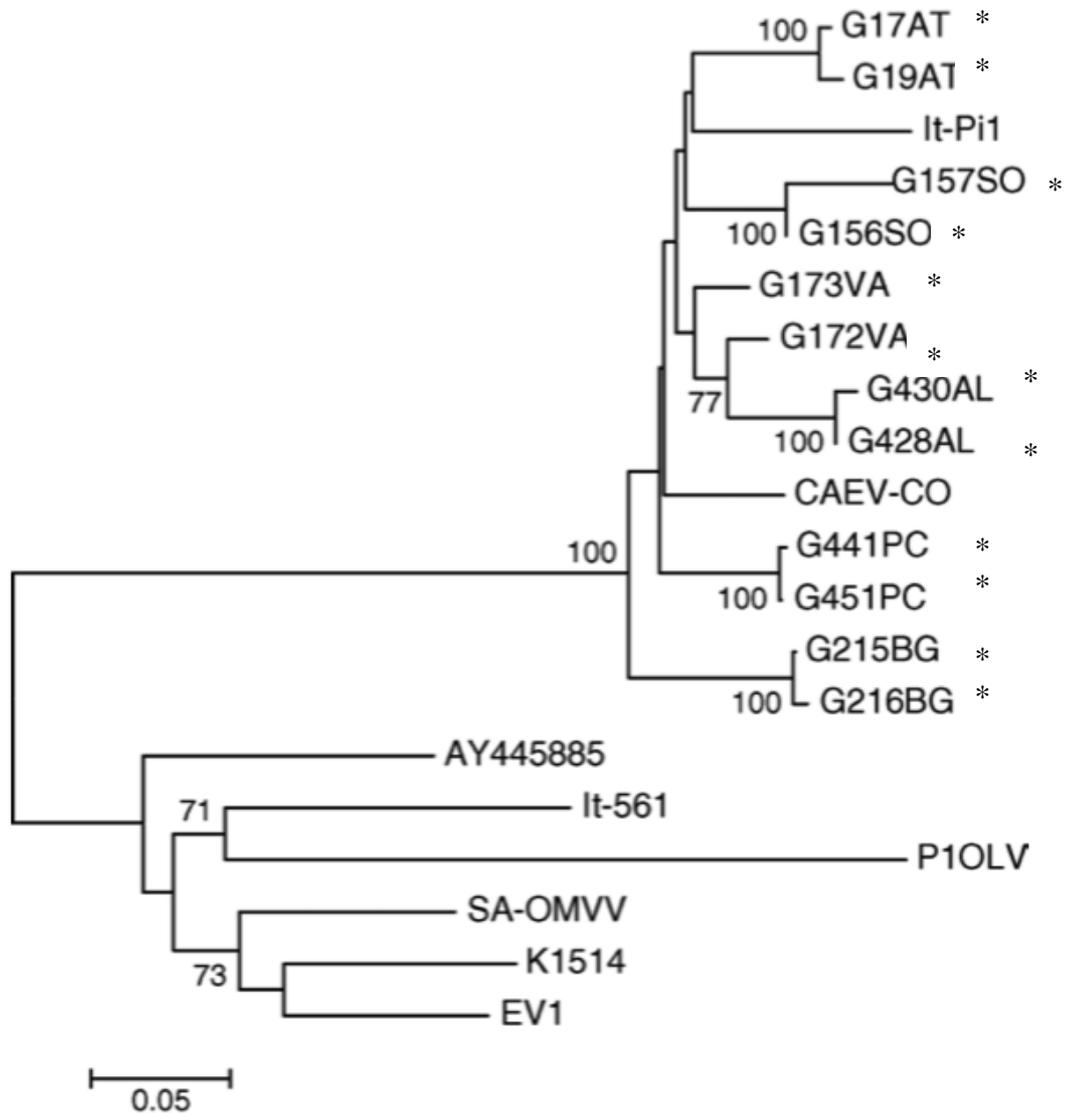
### 23.8.1.- Análisis Filogenético

Las distancias de pares genéticos fueron calculadas empleando el programa MEGA versión 2.1 junto con el modelo de substitución de *Tamura-Nei*, aplicando el ajuste por omisión y con la excepción de que todos los sitios con códigos ambiguos o huecos, fueron omitidos. La construcción filogenética fue hecha usando el método *Neighbour-Joining* (NJ) implementado en el programa MEGA con la distancia gamma *Tamura-Nei*. La confianza estadística de las topologías fue evaluada con 1000 replicas de *bootstrap*. La forma del parámetro *alpha* para una distribución gamma discreta del rango de substitución, y la transición/transversión de la proporción del rango del parámetro *kappa* fue estimada simultáneamente por el máximo parecido usando el programa Yang's BASEML implementado en el paquete del programa PAML (por sus siglas en inglés *Phylogenetic Análisis by Maximum Likelihood*). El modelo de substitución asumido fue Felsenstein F84, el cual acomoda frecuencias de bases desiguales y rangos de transición/transversión parciales (Pisoni *et al.*, 2006).

Los resultados mostraron que los aislados italianos están más estrechamente relacionados al prototipo CAEV-CO con un valor de *bootstrap* de 100, que con cualquiera de las cepas de prototipos de MV como se muestra en la figura 28. Las secuencias aisladas de LVPR fueron analizadas comparando todas las secuencias de LVPR disponibles tomadas de las bases de datos, pudiendo ser divididas en dos: aislados parecidos a AEC y aislados parecidos a MV (Pisoni *et al.*, 2006).

**Figura 28**

**Relación filogenético entre los LVPR italianos y los obtenidos a partir de bases de datos**



Las secuencias de este árbol fueron nombradas como sigue G\_NNN\_P, donde G representa Goat (cabra); NNN: número de secuencia; y P: provincia de origen. AT (Asti), SO (Sondrio), VA (Varese), AL (Alessandria), PC (Piacenza), BG (Bérgamo). Las secuencias representativas de Genbank de AEC y MV (números de acceso) son: M33677 (CAEV-CO); AY265456 (It-Pi1); AY 265455 (It-561); S51392 (EV1); M60609 (K1514); M31646 (SA-OMVV); AF479638 (PIOLV), AY445885(Pisoni *et al.*, 2006).

**Nota: (\*) Son las cepas italianas aisladas.**

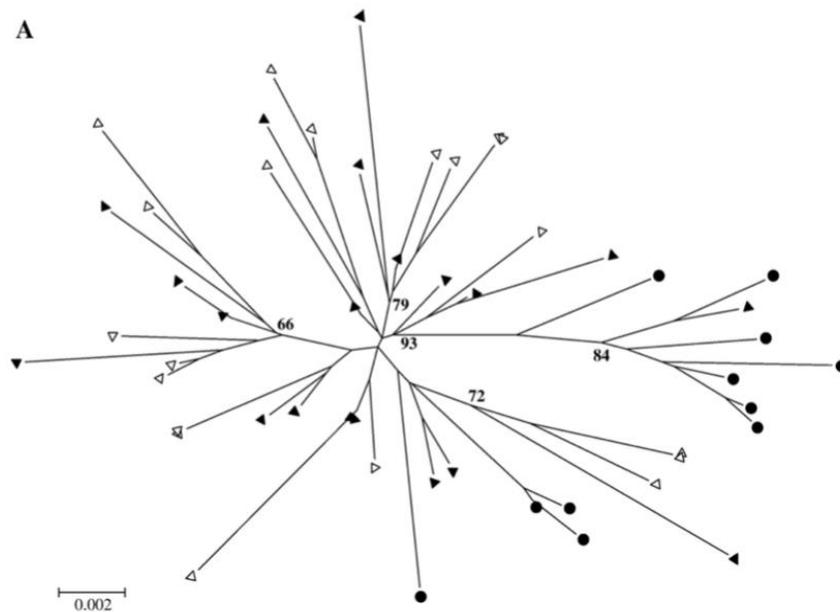
### 23.9.- Compartimentalización de los LVPR entre sangre y calostro de cabras infectadas

En este trabajo se realizó un análisis filogenético de forma paralela entre sangre y calostro, donde se demostró la diferencia entre las secuencias virales agrupadas en el gen *env* en los sitios analizados. El trabajo abunda la relación entre la evolución genética de LVPR en sitios anatómicos específicos y las propiedades biológicas de las secuencias del gen *env* (Pisoni *et al.*, 2007).

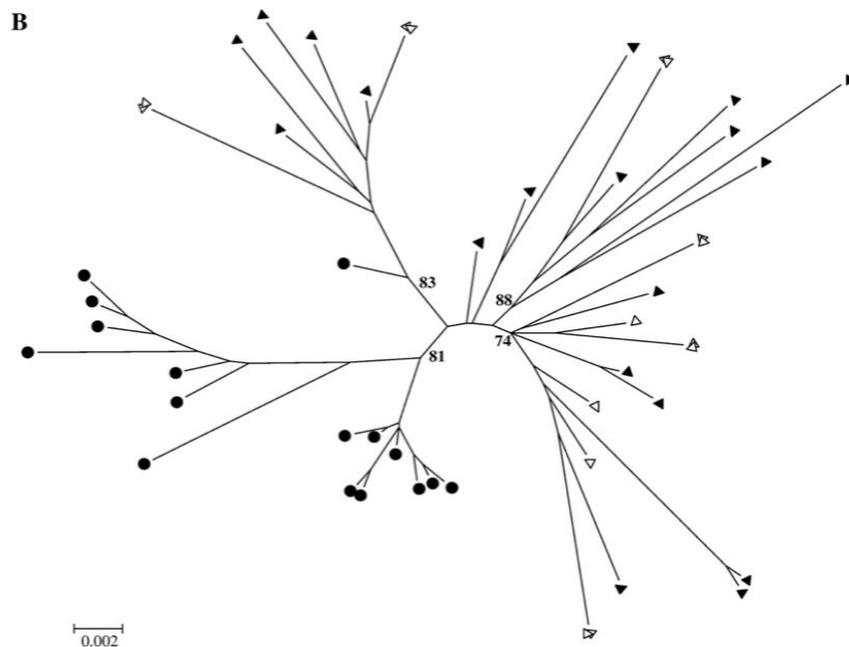
En las figuras 29 A, 29 B, 29 C y 29 D se observan árboles filogenéticos de una región de la envoltura de clones, derivados de sangre y calostro de cabras las cuales fueron analizadas en el trabajo “*Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats*”. Estos árboles fueron construidos por el método *neighbor-joining*. Los árboles de A-D están representados por las cabras números 12, 13, 658 y 666 respectivamente. Para cabras que estaban co-infectadas (12 y 13), sólo las secuencias de los virus aislados tanto en sangre como en calostro están representadas en los árboles filogenéticos A (secuencias de virus parecido a MV) y B (secuencias de virus parecido a AEC). Se indican los valores de *bootstrap* (Pisoni *et al.*, 2007).

**Figura 29 A y B**

**Árboles filogenéticos una región de la envoltura de clones virales de LVPR obtenidos de sangre y calostro encontrados en la compartimentalización de LVPR**



*Pisoni et al., 2007*



*Pisoni et al., 2007*

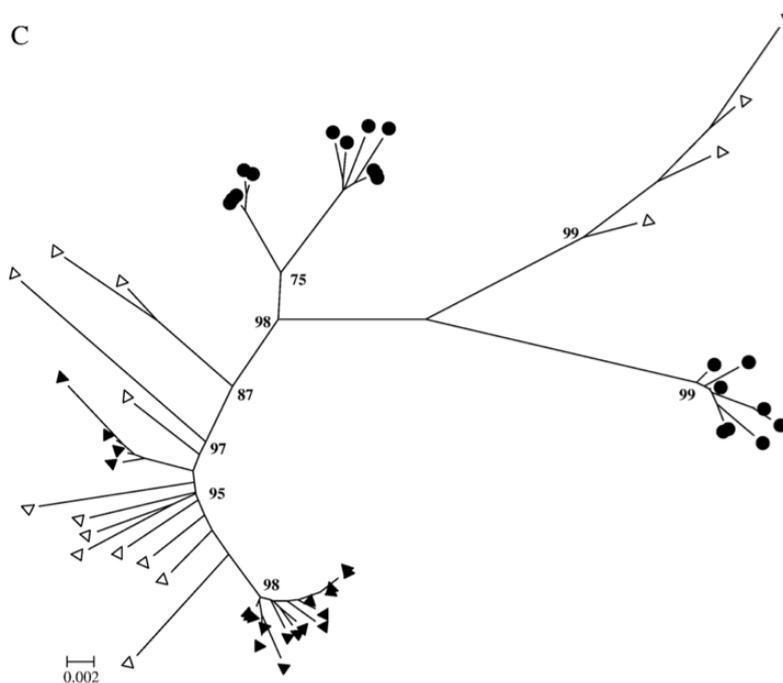
En las figuras:

- El círculo completo significa secuencias provirales derivadas de la sangre
- Un triángulo completo representa secuencias **provirales** derivadas de calostro
- Un triángulo abierto representa secuencias virales derivadas de calostro

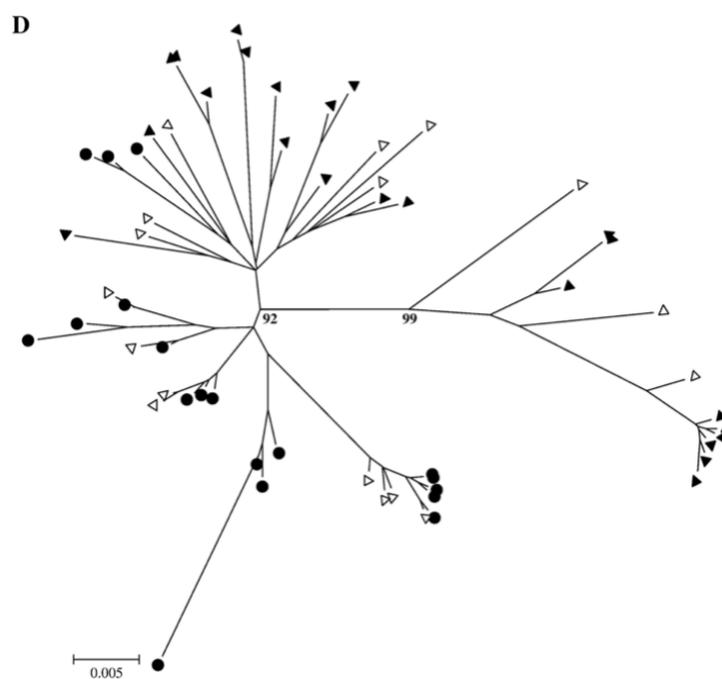


Figura 29 C y D

Árboles filogenéticos de una región de la envoltura de clones virales de LVPR obtenidos de sangre y calostro encontrados en la compartimentalización de LVPR



Pisoni *et al.*, 2007



Pisoni *et al.*, 2007

En las figuras:

- El círculo completo significa secuencias provirales derivadas de la sangre
- Un triángulo completo representa secuencias **provirales** derivadas de calostro
- Un triángulo abierto representa secuencias virales derivadas de calostro



### 23.9.1.- Análisis filogenético

Para el análisis filogenético se empleó una combinación de diluciones limitantes de la PCR, seguida por la clonación y secuenciación para excluir el re-muestreo de secuencias provirales que se sabe ocurre durante los procedimientos de PCR-secuenciado-clonado (Pisoni *et al.*, 2007).

Se encontró que las secuencias obtenidas a partir de células mononucleares de sangre periférica de dos animales (12 y 13), se agruparon en dos distintos grupos de LVPR A y B. En contraste, sólo un subtipo, A o B, fue encontrado en el calostro de la cabra 12 y 13 respectivamente. Fue detectado también tanto en la sangre como en el calostro de la cabra 12 un virus recombinante con los subtipos A y B en su secuencias *env*. Las secuencias de los otros dos animales (658 y 666) se agruparon con otras secuencias de referencia del subtipo B de LVPR, en sangre y en calostro. Las secuencias derivadas de *env* un animal determinado se agrupa juntas, excluyendo cualquier contaminación cruzada entre muestras derivadas de los diferentes animales (soportada por 100 % de las muestras *bootstrap* de las muestras). Las figuras A, B, C y D representan los árboles filogenéticos generados con secuencias pertenecientes al mismo subtipo de LVPR y obtenido a partir de sangre y calostro para cada uno de los cuatro animales (Pisoni *et al.*, 2007).

En tres de las cuatro series de datos, las secuencias provirales derivadas de calostro fueron agrupadas fuertemente con secuencias provirales derivadas de sangre (solo se encontró un caso de compartimentalización del virus tejido-específico para la cabra 658) (Pisoni *et al.*, 2007).

En las cabras 13 y 666, se encontraron variantes provirales menores en sangre (valores de *bootstrap* de más de 80%) con secuencias virales y provirales de calostro (Pisoni *et al.*, 2007).

Las secuencias virales de calostro formaron subgrupos entre el radio de secuencias provirales del mismo compartimento. Esta agrupación calostro específica fue evidente para las cabras número 13 y 666 (B y D). Para las otras cabras (A y C), una agrupación sangre tejido-específica también fue observada, particularmente en la cabra número 658, donde un subgrupo de secuencias virales derivadas de calostro parece emerger a partir del grupo de secuencias provirales de sangre (Pisoni *et al.*, 2007).

### 23.9.2.- Compartimentalización filogenética

La compartimentalización de las quasi-especies de LVPR fue evaluada en células mononucleares de sangre periférica y células somáticas de calostro. En particular en el mapeo de similitudes de grupos independientes de células mononucleares de sangre periférica y secuencias provirales de calostro; donde se reveló la significancia en la agrupación de quasi-especies de células mononucleares de sangre periférica en las cabras número 13, 658 y 666 (el porcentaje de cuartos apoyando esta topología varía del 70% al 100%). El análisis del mapeo de similitudes (LMA por sus siglas en inglés *Likelihood Mapping Analysis*) para la compartimentalización de secuencias virales de calostro reveló un importante agrupación de las mismas cabras pero con un porcentaje menor de cuartos apoyando esta topología de 68% a 88%. En la cabra 13 no se observó compartimentación de secuencias virales de calostro (Pisoni *et al.*, 2007).

### 23.10.- Transmisión natural y análisis comparativo de LVPR en las poblaciones de oveja y cabras

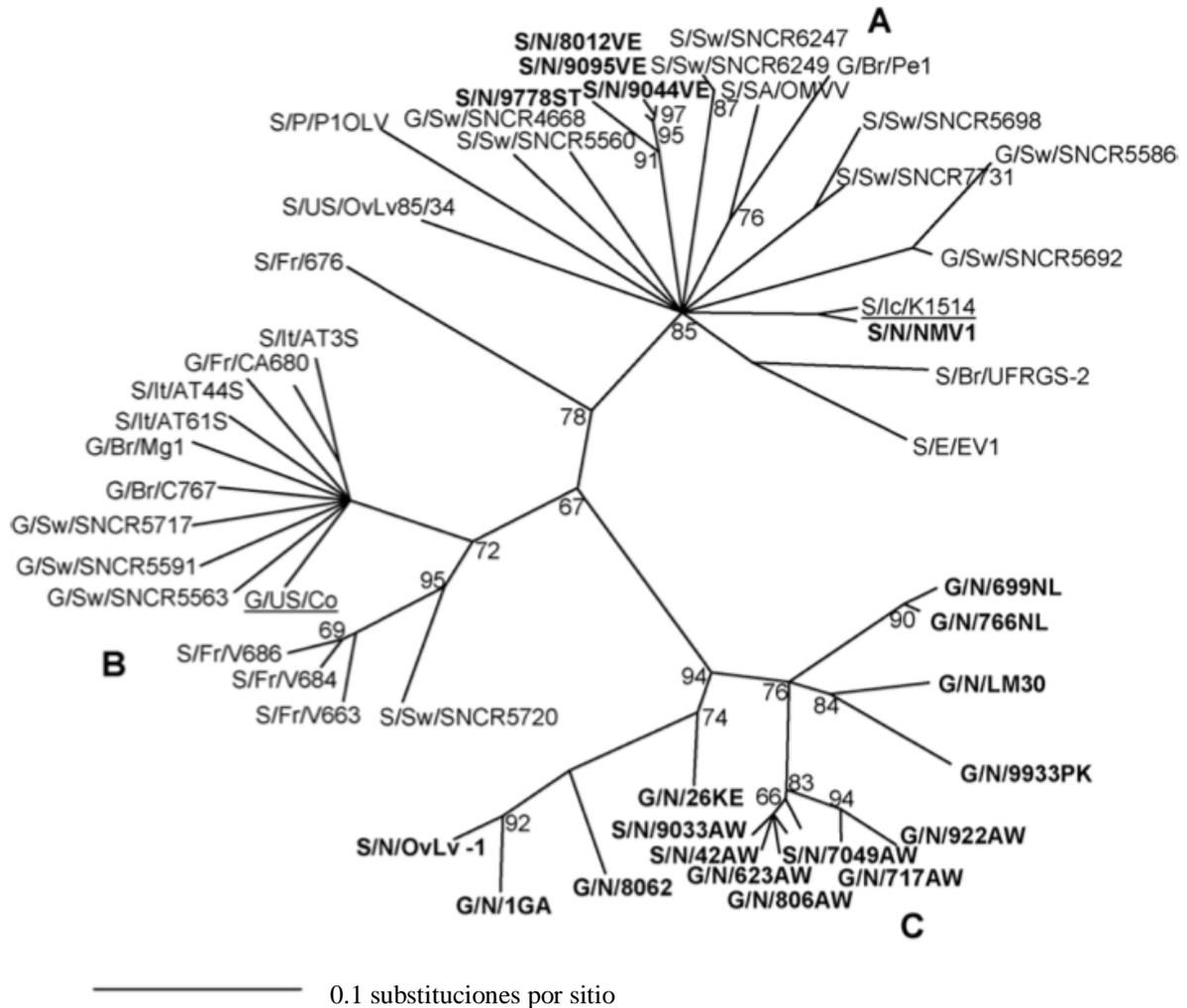
Los árboles se construyeron para analizar las secuencias de los genes *pol* y *env*. De acuerdo con la clasificación de LVPR, los LVPR noruegos derivados de cabras corresponden al grupo C. Las secuencias dentro del grupo A y C han sido aisladas tanto de cabras como ovejas. Este estudio muestra que los LVPR noruegos derivados tanto de cabras como de ovejas en hatos mixtos están distribuidos dentro del grupo C, indicando que el contagio es de cabras a ovejas, mientras que los LVPR aislados de ovejas provenientes de hatos que consisten sólo de ovejas y está presente dentro del grupo A (Gjerset *et al.*, 2007).

Los árboles filogenéticos para evaluar el gen *pol*, fueron construidos usando secuencias obtenidas de la base de datos de GenBank y 20 secuencias aisladas del gen *pol* de este estudio. Los aislados de LVPR noruegos de cabras y ovejas provenientes de hatos mixtos forman un grupo filogenético denominado C con valores de *bootstrap* de 94, mientras que aislados de hatos que consisten sólo de ovejas; estos se agrupan en el grupo A (Gjerset *et al.*, 2007).

La relación filogenética encontrada usando la región *pol* fue confirmada con las secuencias de *env*. La topología del árbol basado en las secuencias disponibles a partir de la región que codifica para la superficie (*env*), mostró que las secuencias que entran en el grupo C representan a los aislados de hatos mixtos de cabras y ovejas (30 A y 30 B) (Gjerset *et al.*, 2007).

**Figura 30 A**

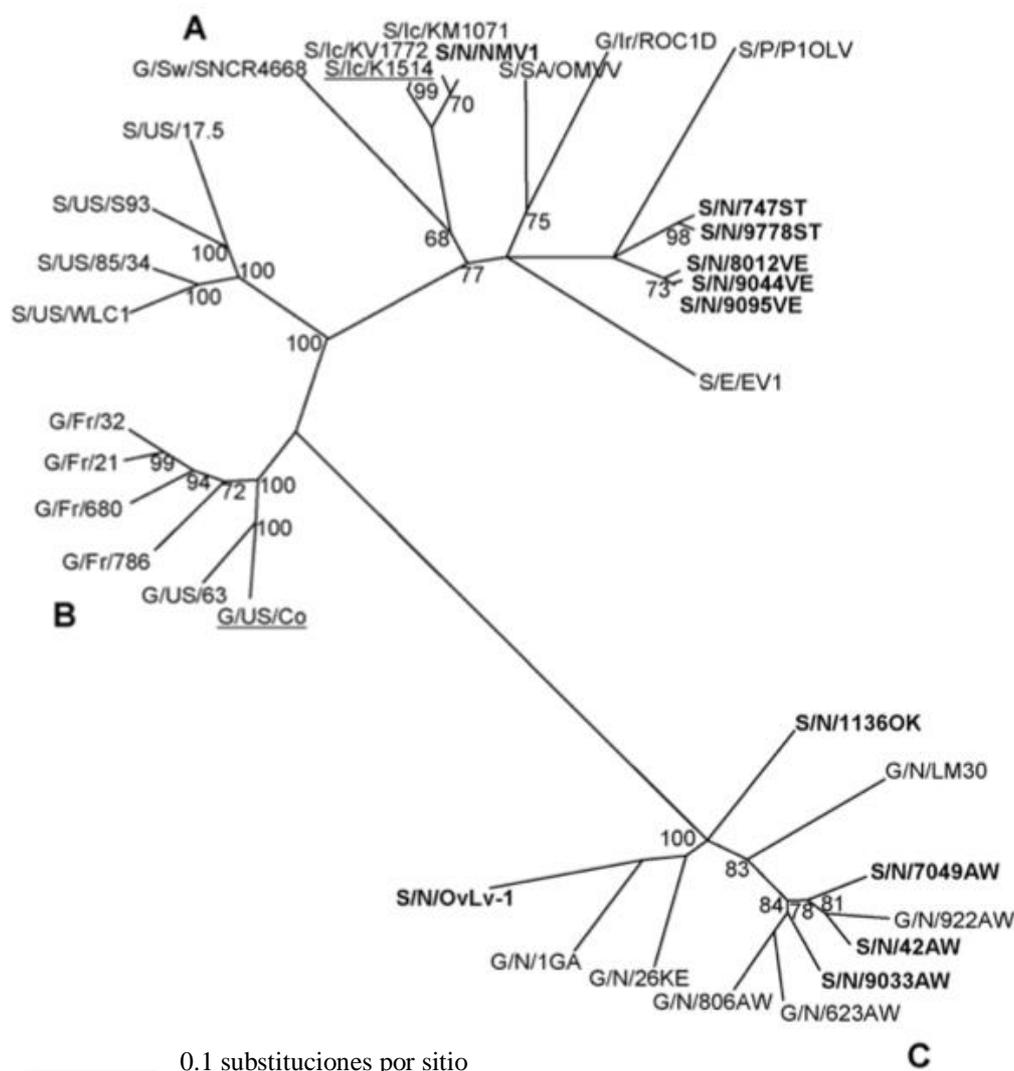
**Árboles sin raíz basados en secuencias del gen *pol* de LVPR**



Árbol sin raíz del alineamiento de 432 pb de secuencias del gen *pol* de LVPR. Los nombres de los aislados se encuentran escritos en **negrita**, indicando con una S (sheep) si es de oveja o G (Goat) si es de cabra y el código para determinar el país es N (Noruega). Las secuencias obtenidas de GenBank están marcadas con la especie, código de país (Br, Brasil; E, England (Inglaterra); Fr, Francia; Ic, Iceland (Islandia); Ir, Irlanda; It, Italia; N, Noruega; P, Portugal; SA, Sudáfrica; Sw, Switzerland (Suiza); US, Estados Unidos (United States)) y el nombre del aislado. Los aislados prototípicos CAEV-Co y MVV-K1514 están subrayados. Los grupos propuestos por Shah *et al.*, (2004a), están indicados. Las ramas están dibujadas a escala. Los números de acceso son: Co (M33677), K1514 (M10608), EV1 (S51392), UFRGS-2 (AJ305050), SNCR5692 (AY454208), SNCR5586 (AY454186), SNCR7731 (AY577033), SNCR5698 (AY454210), Pe1 (AF108065), SA-OMVV (S31646), SNCR6249 (AY454232), SNCR6247 (AY454231), SNCR5560 (AY454175), SNCR4668 (AY445885), PIOLV (AF479638), OvLv85/34 (AY101611), 676 (U35676), AT3S (DQ013234), CA680 (AF015182), AT44S (DQ013224), Mg1 (AF108049), C767 (AJ305053), SNCR5717 (AY454217), SNCR5591 (AY454187), SNCR5563 (AY454177), V686 (U35681), V663 (U35674), SNCR5720 (AY454218), ROC1D (AJ969038), KM1071 (U51910), KV1772 (S55323), 17.5 (AY362030), S93 (AF338226), 85/34 (U64439), WLC1 (AY362038), 32 (AJ400720), 21 (AJ400719), 680 (AJ400718), 786 (AJ400721), 63 (M60855), IGA (DQ015916), 26KE (DQ015913), G623AW (DQ015912), G922AW (DQ015914) y LM30 (DQ015915) (Gjerset *et al.*, 2007).

**Figura 30 B**

**Árboles sin raíz basados en secuencias del gen *env* de LVPR**



Árbol sin raíz del alineamiento de secuencias de SU del gen *env* de LVPR (figura B). Los nombres de los aislados se encuentran escritos en **negrita**, indicando con una S (sheep) si es de oveja o G (Goat) si es de cabra y el código para determinar el país es N (Noruega). Las secuencias obtenidas de GenBank están marcadas con la especie, código de país (Br, Brasil; E, England (Inglaterra); Fr, Francia; Ic, Iceland (Islandia); Ir, Irlanda; It, Italia; N, Noruega; P, Portugal; SA, Sudáfrica; Sw, Switzerland (Suiza); US, Estados Unidos (United States)) y el nombre del aislado. Los aislados prototípicos CAEV-Co y MVV-K1514 están subrayados. Los grupos propuestos por Shah *et al.*, (2004a), están indicados. Las ramas están dibujadas a escala. Los números de acceso son: Co (M33677), K1514 (M10608), EV1 (S51392), UFRGS-2 (AJ305050), SNCR5692 (AY454208), SNCR5586 (AY454186), SNCR7731 (AY577033), SNCR5698 (AY454210), Pe1 (AF108065), SA-OMVV (S31646), SNCR6249 (AY454232), SNCR6247 (AY454231), SNCR5560 (AY454175), SNCR4668 (AY445885), P1OLV (AF479638), OvLv85/34 (AY101611), 676 (U35676), AT3S (DQ013234), CA680 (AF015182), AT44S (DQ013224), Mg1 (AF108049), C767 (AJ305053), SNCR5717 (AY454217), SNCR5591 (AY454187), SNCR5563 (AY454177), V686 (U35681), V663 (U35674), SNCR5720 (AY454218), ROC1D (AJ969038), KM1071 (U51910), KV1772 (S55323), 17.5 (AY362030), S93 (AF338226), 85/34 (U64439), WLC1 (AY362038), 32 (AJ400720), 21 (AJ400719), 680 (AJ400718), 786 (AJ400721), 63 (M60855), IGA (DQ015916), 26KE (DQ015913), G623AW (DQ015912), G922AW (DQ015914) y LM30 (DQ015915) (Gjerset *et al.*, 2007).

## **23.11.- Impacto de la transmisión natural oveja-cabra en la detección y control de la infección con LVPR pertenecientes al grupo C**

### 23.11.1.- Análisis filogenético

Un árbol filogenético fue construido usando 46 secuencias aisladas del gen *gag* y aislados prototipo de LVPR pertenecientes al genogrupo A-C. En el genogrupo C, las secuencias del gen *gag* dentro de dos subgrupos con un valor *bootstrap* de 91%. La distancia nucleotídica estimada entre los dos subgrupos fue de 11-25%. Las secuencias obtenidas a partir de ovejas y cabras muestran una agrupación intra-hatos, con una divergencia nucleotídica de 2-10%. La secuencia del virus 1GA de AEC aislado en 1991, diverge en un promedio de 6% de la secuencia viral obtenida de la misma granja en 2003. Dentro del genogrupo A, la distribución promedio intra-hatos fue de 4.3%, mientras que la distancia entre el virus de MV NMV1, aislado en 1976, y los actuales aislados noruegos en el grupo A fue de 12.6% (Gjerset *et al.*, 2009).

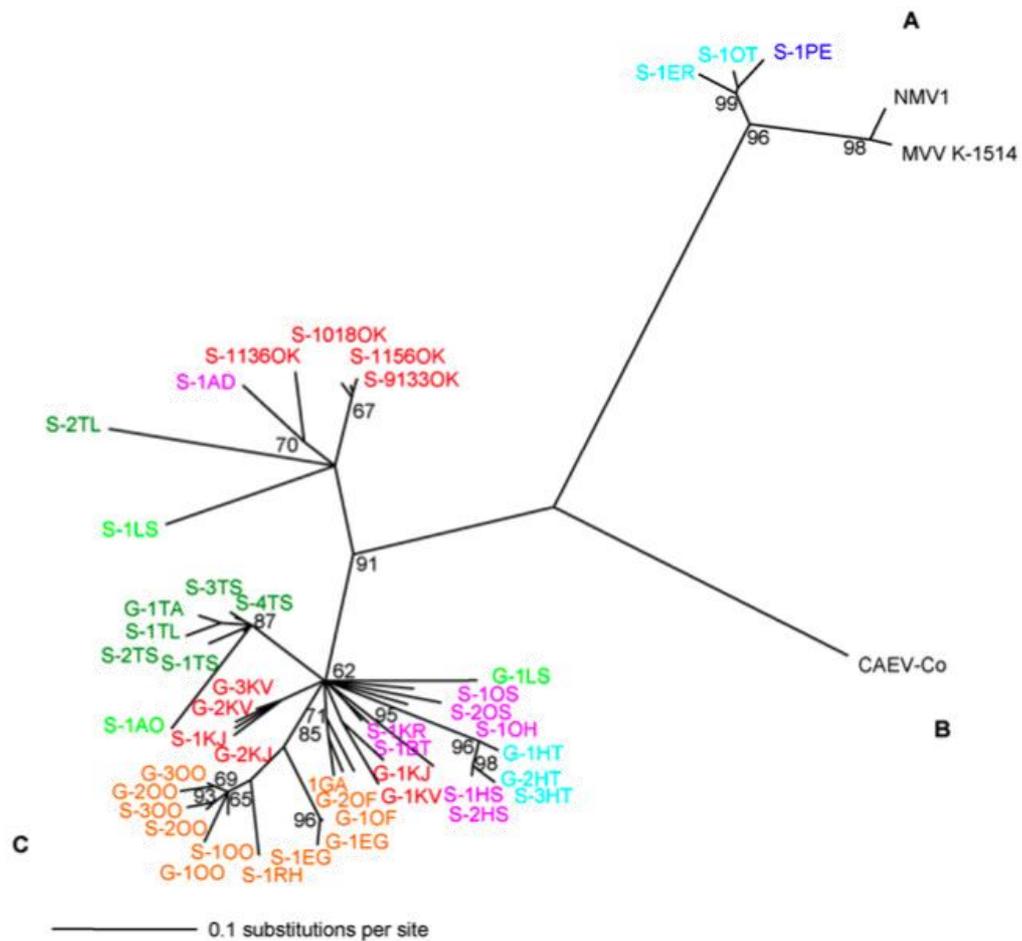
### 23.11.2.- Análisis de la secuencia *gag*

El alineamiento de la secuencia de un fragmento *gag* correspondiente al residuo 19-156 de la proteína de matriz de AEC mostró muchas regiones con compuestos conservados, y una región altamente variable en la parte C terminal (figura 31). Comparado con las secuencias pertenecientes al genogrupo A, deleciones de 4-13 aminoácidos fueron observadas en las secuencias del genogrupo C, mientras que una deleción de 7 aminoácidos en la región variable C Terminal mostró deleciones de secuencias variables de 5 a 9 aminoácidos, mientras que el subgrupo más largo contiene todas las deleciones variantes excepto el tipo aminoácido 5, indicando que todas las deleciones variantes son encontradas en aislados de LVPR de diferentes regiones geográficas (Gjerset *et al.*, 2009).

En la figura 32 se observa una alineación de secuencias a la proteína de matriz de LVPR.

Figura 31

Árbol filogenético basado en una secuencia del nucleótido 437 del gen *gag* que codifica para la proteína de matriz basado en 46 secuencias de LVPR



Los grupos filogenéticos A-C propuestos están indicados. Las secuencias están marcadas de acuerdo a los hospederos cabras (G) y ovejas (S), y el color representa el país común de origen (Gjerset *et al.*, 2009).

Figura 32

**Alineamiento de las secuencias correspondientes a los residuos 19-156 de aminoácidos de la proteína de matriz de LVPR**

```

S-2OS      1 : YPELKECLKKAYKIKVRSGGERLTEGNCLWCIKTLECMYEDCREEPWTPEKCKKLWRRLLKQVEPEESSKADYN
S-1LS     1 : .....A.....C.....N.....H..L.....K.....AR..K.....F.
S-3HT     1 : .....C.....I.....K.....Q...QR..T.V..L.....R
CAEV-Co  1 : ...EK.I.H.C...LR..H...L...DY.F..HK...KV.FRTI.QKV.NLT...N.K.FM
G-2KV     1 : .....V...CR.....N..K.....
G-1EG     1 : .....V...CR.R..A.....Q...R...KK.....R...
S-2TL     1 : .....I...CR...R.....L.....F.G...A..QAR.ENM.QK...L...R..F.
G-1KV     1 : .....I...C.V...P.....L.....Q...R...K.....T...
CAEV-1GA 1 : .....C...A.....Q...KK.....
G-1OF     1 : .....CR...A.....K.....E..K.....
G-1LS     1 : .....C...N.....N.....N.....N.....
S-1BT     1 : .....C...N.....K.....
MVV-1514 1 : ...VI.ATC..R.GP.K.T...AL..IDFIF..LKT...IT.MYTV.D...GLT...T..REFA
S-1PE     1 : .....VI.ATC...GA.K.T...AL..IDFIF..IIT...LT.MYTV.N...LT...T..REFA

S-2OS     74 : SLKATLAGIVCVQMGMQPETLQDAVATLNMNRDEVEEKGQKKEKE----KPEGQKKEGLYPILVQAGGGRWR
S-1LS     74 : .....I.....L..V..K...KKREK-----E...E.....
S-3HT     74 : .....L.....K...R.NQKAET-----IKEE.....M.....K
CAEV-Co  74 : ..Q...LM.C...R...M..VI.K.GIL.QEE...-----EDKRE.E.SVF..V..A...S.K
G-2KV     74 : .....I.....I.....KGEKKQE-----EKKQEE.K.....G..
G-1EG     74 : .....I.....K...K..EKE...-----KAERK.....
S-2TL     74 : .....LI..LK.....S.T...K..KKE...-----KPEE.A.L...I..A...S.K
G-1KV     74 : .....I.....I.....KRGKETQ-----QEE.K.....
CAEV-1GA 74 : .....I.....I.....KG.EKPS-----EE.K.....
G-1OF     74 : .....I.....I.....KG.EKQS-----EE.K.....
G-1LS     74 : A.....I...Q.K...GKEK-----PKEEPK.M.....K
S-1BT     74 : .....K.TK-----AEE.K.....
MVV-1514 74 : ..Q...C.M.S...K...V.A.KGIIS.KEGLH.NKEA.GEKVEQLY.NLE.HREV...VNLQA...S.K
S-1PE     74 : ..Q...C.M.S...K...V.A.RGIIS.KEGLQ.NKED...KVEQLY.NLERHREV...VNLQA...S.K

```

Alineado de secuencias correspondientes al residuo 19-156 de la proteína de matriz de AEC, con CAEV-Co (grupo B, M336779), CAEV-1GA (grupo C, DQ015916) y MVVK-1514 (grupo A, M10608), las secuencias prototípicas se muestran en negritas y nuevas secuencias de LVPR representando diez deleciones variantes. La región altamente variable terminal C está dentro del recuadro. Los espacios están representados por guiones (Gjerset *et al.*, 2009)

## 24.- DISCUSIÓN

Los retrovirus están ampliamente distribuidos en la mayoría de los vertebrados, y LVPR son parte de esta familia (ICTV 2006). En la figura 1 se muestran los principales genes de LVPR (*gag, pol, env, vif, tat, rev*), los cuales tienen diferentes funciones descritas en este trabajo (Murphy, 1999; Demirov *et al.*, 2004; Bertoni, 2007; Leroux y Mornex, 2008), los tres primeros genes de LVPR son los más utilizados para hacer los estudios de filogenia, aunque pueden utilizarse otras regiones como la LTR.

Los LVPR son responsables de enfermedades progresivas y degenerativas que conllevan a la muerte en pocos meses o hasta años. Las reconstrucciones filogenéticas basadas en secuencias parciales establecen claramente la evidencia de transmisiones entre especies.

En la figura 2 se muestra una representación esquemática de forma general de una partícula retroviral. Un mejor entendimiento de la estructura, así como del mecanismo viral, puede llevar a un mejor entendimiento de la patogenicidad, y puede ser un paso para el control de la diseminación de estas infecciones.

Además de las consecuencias en la salud animal, los LVPR son también un buen modelo para estudiar infecciones virales en humanos.

En la figura 3 se muestra una visión general del ciclo de replicación de los retrovirus, este tiene un gran impacto en la relación virus-hospedero, ya que al tener una gran capacidad de mutación debido a que el copiado de ARN a ADN por medio de la transcriptasa reversa es inexacto puede llevar a la aparición de nuevos subtipos virales que en el futuro pueden ser más infecciosos o causar lesiones en el hospedador diferentes a las cepas virales que hasta ahora se conocen.

La transmisión de los LVPR a través de ingestión de calostro, es considerada una ruta de transmisión muy importante. Aunque algunos autores como Straub (2004), en su trabajo “infección de la oveja con MV. Historia y conocimiento presente”, considera que la ruta más importante para la transmisión del virus son las descargas nasales, mas aún, cuando las ovejas son hacinadas en corrales o sistemas intensivos, donde son más susceptibles a contraer el virus por medio de contacto directo.

En el trabajo, Transmisión calostrual de MV: sitios de entrada viral en corderos nacidos de ovejas experimentalmente infectadas de Preziuso *et al.*, (2004), se examinaron muestras de intestino tomadas de corderos de diferentes edades los cuales se alimentaron con calostro de madres experimentalmente infectadas. En las figuras 4 y 5 se observan algunas de estas muestras de intestino que se examinaron por diferentes métodos y tinciones, en los que los resultados mostraron una absorción viral, los cuales tienen diferentes patrones de tinción dependiendo del tiempo de infección.

Los resultados contribuyen al conocimiento acerca de la patogénesis LVPR, sugiriendo que el intestino es un sitio de propagación de los LVPR en corderos que toman calostro de madres infectadas, lo que confirma también la excreción mamaria del virus.

Se dice que los LVPR llegan al intestino por medio del calostro en macrófagos; en las primeras 48 horas después del nacimiento la barrera intestinal es muy permeable, es por eso que el virus puede pasar a través del epitelio y llegar a los nodos linfáticos.

En el estudio de Schnorr y Peterson (1984), se observó que leucocitos calostrales infectados con LVPR pueden ser absorbidos por el intestino intacto (sin lesiones) del neonato como una forma de infección.

Aunque el mecanismo por el cual los LVPR cruzan la barrera intestinal no es muy bien conocido, se sugiere que las células epiteliales transportan al virus por medio de transcitosis, similar al propuesto por Lehner *et al.*, (1991) para el SIDA, aunque este mecanismo no ha sido descrito aun.

Es por esto que conocer el mecanismo de entrada al intestino y su diseminación en recién nacidos puede apoyar los mecanismos para tomar medidas preventivas.

En las figuras 6 y 7 procedentes del trabajo de diagnóstico de casos clínicos de la forma nerviosa de MV en corderos de 4 a 6 meses de Benavides *et al.*, (2007), la investigación demostró que la presentación nerviosa de MV, que se reporta ocurre en ovejas adultas, descrita por primera vez por Sigurdsson *et al.*, (1957), también puede presentarse en ovejas jóvenes, con los mismos signos clínicos de incoordinación y recumbencia. También se encontraron hallazgos en la histopatología, como encefalitis severa no purulenta afectando principalmente los pedúnculos cerebelares.

Por otro lado, en AEC donde es más frecuente la presentación de encefalitis en animales jóvenes de 2 a 6 meses, esto se observó en el trabajo hecho por Callan y Metre (2004), casos de encefalitis en caprinos adultos debido al virus de AEC, aunque se sabe que la encefalitis sólo había sido reportada hasta ese momento en cabritos.

Estos estudios, pueden llevar a pensar que ocurren de manera natural aunque sea de forma esporádica.

Las articulaciones carpales son más comúnmente afectadas por LVPR, para el caso de los caprinos, aunque pueden verse afectadas otras articulaciones; cabe mencionar que solo un tercio de los animales muestran signos clínicos. Se ha demostrado que hay una predisposición genética para desarrollar manifestaciones clínicas de artritis debido a la infección por LVPR, en contraste no hay evidencia de resistencia genética a la infección.

La infección por LVPR se caracteriza por tener un curso lento pero progresivo, en estados tardíos, se puede observar a las cabras caminar con los miembros flexionados. Estos animales pueden tener pobre condición corporal y mal aspecto general. En la figura 8 se muestra un caprino afectado por LVPR, donde están afectadas las articulaciones carpales, y tiene una pobre condición corporal, pelo hirsuto, y en general un mal aspecto.

En la figura 9 se observan articulaciones carpales de caprino diseccionadas, en donde se puede apreciar la lesión debida a LVPR.

Infecciones experimentales con AEC han revelado una clara asociación entre la carga viral y la severidad de las lesiones en las articulaciones carpales. Los análisis hechos con rayos x pueden detectar los cambios patológicos en la articulación, como la mineralización del tejido y erosiones en la superficie articular. Las articulaciones afectadas contienen excesivo líquido sinovial con abundantes células inflamatorias mononucleares presentes al aspirado.

La bioinformática es una ciencia de análisis cuantitativo de la información relacionada con macromoléculas biológicas con la ayuda de programas computacionales. Por medio de esta ciencia, se puede hacer un estudio molecular detallado del genoma de los organismos.

En la figura 10 se muestra de forma esquemática una visión general de la bioinformática donde se observan los pasos que sigue la investigación, desde el estudio de genes, los cuales son secuenciados, luego son almacenados en las bases de datos en la red, y por medio de programas computacionales son analizados para diferentes propósitos como son: relaciones entre los organismos o la creación de nuevas drogas más eficaces para el control de enfermedades. El objetivo principal de estas técnicas es la utilización de recursos computacionales para solucionar o investigar problemas sobre escalas de tal magnitud que sobrepasan el discernimiento humano.

Las tecnologías de la información jugarán un papel fundamental en la aplicación de los desarrollos tecnológicos en el campo de la genética a la práctica médica como refleja la presencia de la Bioinformática médica. La aplicación de los conocimientos en genética molecular y las nuevas tecnologías son necesarios para el mantenimiento de la competitividad del sistema sanitario no sólo paliativo sino preventivo. La identificación de las causas moleculares de las enfermedades junto con el desarrollo de la industria biotecnológica en general y de la farmacéutica en particular permitirán el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico, desarrollo de fármacos personalizados y una mejor medicina preventiva.

En la figura 11 se muestra de manera esquemática una aproximación de una arquitectura genérica de un sistema bioinformático, donde se observa la estructura que está dividido en partes: sistemas fuente, donde están los laboratorios y/o centro de investigación y donde la información que sale de estos se divide en dos: fuentes privadas y fuentes públicas.

Procesamiento de datos donde se encuentran los *datawarehouse* encargados de concentrar y modelar la información para luego crear *datamarts* de contexto específico. Ya que se tiene la información en una presentación más adecuada puede procederse a explotarla por medio de diferentes herramientas (por ejemplo OLAP/minería de datos). Por último están los clientes, considerados sistemas de explotación, que pueden ser navegadores de Internet o de clientes propietarios que se comunican con un servidor para procesar información específica.

Esta figura explica de manera general el flujo y clasificación de la información hasta que esta llega al cliente o consumidores.

En la figura 12 se muestra un esquema de un cladograma, estos son similares a los diagramas de huevo, o bien a los genogramas. Sin embargo, éstos últimos contienen información de descendencia directa de individuos, mientras que un cladograma sólo representa una descendencia hipotética, además de ser de varias especies y no de organismos de una sola especie. Los cladogramas proveen una imagen visual de como especies nuevas contienen aún características heredadas de antiguas especies. Los biólogos usan los cladogramas para tres propósitos:

1. Probar hipótesis sobre la evolución.
2. Aprender sobre las características de las especies extintas y los linajes ancestrales.
3. Clasificar los organismos según las características que heredaron de un ancestro común de tal forma que la clasificación revele la evolución de las especies.

En la figura 13 se muestra un filograma, el cual es un árbol que muestra relaciones genealógicas entre organismos. Difiere del cladograma, en que las ramas se dibujan proporcionales a la cantidad de cambio evolutivo. Es propio del evolucionismo; también se le llama dendrograma tipológico.

En la figura 14 se muestran las partes de un árbol filogenético, y en las figuras 15 y 16 los dos tipos de árboles que puede haber, con raíz el cual es un árbol directo, con un único nódulo que corresponde al ancestro común más reciente de todas las entidades de las hojas del árbol, o un árbol sin raíz los cuales ilustran la relación de los nódulos de las hojas sin hacer asunciones sobre ascendencia. Mientras que los árboles sin raíz siempre pueden ser generados a partir de árboles con raíz omitiendo esta, una raíz no puede ser inferida a partir de un árbol sin raíz sin algunos medios para identificar la ascendencia. Esto suele hacerse incluyendo un grupo externo en los datos entrantes o introduciendo asunciones adicionales sobre las tasas relativas de evolución en cada rama.

Actualmente, el análisis filogenético se ha convertido en una importante herramienta de la biología para comparar información acerca de genes, individuos, poblaciones, y especies. Este tipo de análisis tiene otras aplicaciones, como reconstruir la secuencia de genes ancestrales a través de genes existentes y derivados; estudiar el origen y epidemiología de las enfermedades (Hillis, 1997; Achtman, 2001; Cates, 2006; Hall y Barlow, 2006).

En el trabajo sobre la caracterización genética de los lentivirus ovinos fenotípicamente distintos de Norte América y su posible origen a partir del virus de AEC (Karr *et al.*, 1996) se examinaron características genéticas de dos lentivirus ovinos norteamericanos fenotípicamente distintos. El análisis de las secuencias de nucleótidos de la región de envoltura de las cepas 85/34 y 84/28 mostraron que están estrechamente relacionados y que estos a su vez se relacionan más con AEC que a MV. Aunque al analizar las sustituciones en las secuencias de nucleótidos de la región *env* se observó que estos cambios resultaron en nucleótidos homólogos a MV. Esto sugiere que estas cepas tal vez se originaron a partir de una infección entre especies, es decir, ovejas se infectaron con AEC, y estos genomas evolucionaron para adaptarse a su nuevo hospedero.

Se construyó un árbol filogenético (figura 17), en el cual agrupó los OvLV 85/34 y 84/28 en un grupo con AEC cepas CO y 63 junto con las cepas OvLV SH11 y SH8, y lejos de este grupo las secuencias de MVV-1772, SA-OMVV y EV1. Estos resultados sugieren una relación evolutiva estrecha de los OvLV con AEC, más que con MV (Karr *et al.*, 1996).

En el cuadro 5 de este mismo trabajo, se muestra un resumen de los cambios de bases de los OvLV en la secuencia del gen *env*, que son diferentes de CAEV-CO, pero que son homólogos a las secuencias de visna, resume el porcentaje de cambios en los nucleótidos de la secuencia del gen *env* 1.6-kb de los OvLV cepas 85/34 y 84/28 y SH11, las cuales se desvían de la secuencia CAEV-CO, pero son homólogos a los nucleótidos correspondientes de las secuencias de los virus visna cepas MVV-1772, SA-OMVV, y EV1. Estos resultados son sugestivos de un estado de evolución en estos genomas de OvLV hacia el genoma de los virus visna en ovejas (Karr *et al.*, 1996).

Con el trabajo de Karr *et al.*, (1996), se demostró que dos cepas fenotípicamente distintas de lentivirus ovinos norte americanos, están relacionadas entre si genéticamente, y que sus regiones *env* son más homólogos a los lentivirus caprinos que a los clásicos lentivirus ovinos. Sin embargo, el análisis de la sustitución de nucleótidos en los genes *env* de estos virus, indicaron que cuando las diferencias entre los dos virus y AEC fueron examinadas, los cambios fueron por lo regular homólogos con los genomas de los virus MV (figura 18), lo que sugiere que los dos OvLV norteamericanos tal vez se originaron a partir de AEC o virus parecidos a este, posiblemente por transmisión entre especies de forma natural de cabra hacia oveja, y la adaptación subsecuente del virus en la oveja por medio de la evolución en su genoma (Karr *et al.*, 1996).

En otro trabajo similar al de Karr *et al.*, (1996) hecho por Leroux *et al.*, (2008) encontró que virus obtenidos de ovejas en Francia eran más homólogos a AEC que a MV en los análisis filogenéticos hechos a partir de las secuencias de nucleótidos en el gen *pol*, este estudio a su vez concuerda con lo realizado por Chebloune *et al.*, (1996) sobre ovejas naturalmente infectadas en Norteamérica, donde las ovejas se infectan con lentivirus más parecidos AEC que a MV, lo que sugiere que esto puede también ocurrir en diferentes partes del mundo.

La aplicación de estos estudios tanto a las secuencias de AEC como a las de MV es de crucial importancia para el análisis epidemiológico de las infecciones con LVPR, y para estudiar las diferencias en la virulencia entre las cepas existentes de LVPR. La clasificación de los LVPR basado en sus especies hospederas es incorrecto, muchos análisis filogenéticos han demostrado que tanto ovejas como cabras se infectan con LVPR de forma indistinta (Pisoni *et al.*, 2006, Gjerset *et al.*, 2007).

En el trabajo de virus de AEC de Francia y Norte América emergen a partir de MV (Valas *et al.*, 1997), las figura 19a, 19b y 19c muestran árboles en donde se describe la relación filogenética de un aislado lentiviral caprino francés (CA680) con los otros aislados caprinos. Muestra que este aislado caprino está agrupado con el aislado Cork en una rama relacionada de forma distante al grupo de MV consistentes en aislados de EV-1, SA-OMVV, ZZV1050, y K1514 (Valas *et al.*, 1997). En la figura 19c el árbol confirma que el grupo AEC incluyendo al aislado CA680 forma un grupo relacionado de forma distante a los prototipos MV (Valas *et al.*, 1997). Por lo tanto se puede decir que el aislado caprino no emergió a partir de MV por lo observado antes en los árboles.

La principal conclusión del trabajo de Valas *et al.*, 1997 derivado del análisis filogenético, es que a pesar del origen geográfico, la cepa CA680, estaba más estrechamente relacionada a CAEV Cork de Estado Unidos que a todos los otros LVPR aislados de ovinos de USA, Islandia, Noruega e incluso Francia.

En cualquier caso todos los LVPR caprinos caracterizados hasta ahora están más relacionados entre ellos que con los prototipos de MV.

Se sugiere que tal vez ocurrió un evento en LVPR ovinos ancestrales que llevaron a un LVPR a adaptarse al hospedador caprino. Esta hipótesis no excluye el potencial de los LVPR caprinos para infectar al hospedador ovino. Esta posibilidad está sustentada por la existencia de los provirus inexpresables de los virus SH8 y SH11 (Chebloune *et al.*, 1996), y por numerosas secuencias de LVPR a partir de hospedadores ovinos (Zanoni *et al.*, 1992).

En el artículo llamado: Virus de AEC y MV: Especies distintas o quasiespecies, y sus implicaciones para diagnóstico de laboratorio de Pasick (1998), se dice que el hecho de que los lentivirus existan como quasiespecies se debe a que el polimerasa dependiente ARN tiene un alto rango de error y un pobre mecanismo de corrección, el resultado es que los virus ARN se replican de manera imperfecta, por lo tanto el rango de error de la polimerasa dependiente ARN es directamente responsable de determinar el tamaño e integridad de las quasiespecies. Esta variabilidad es no sólo un instrumento en la habilidad de los lentivirus para evadir la respuesta inmune del hospedero, y producir infecciones persistentes, sino también les permite cruzar la barrera entre especies (Pasick 1998).

En el análisis filogenético de LVPR del sur de Brasil hecho por Ravazzolo *et al.*, 2001 en la figura 20 se muestran árboles filogenéticos obtenidos de las secuencias de nucleótidos de los genes *pol* y *gag*, por el método de máxima similitud. Los valores de *bootstrap* son de 100 (para *pol*) y 1000 (para *gag*) replicaciones indicando esto la confianza del patrón de ramificado. Aunque los valores de *bootstrap* del análisis del gen *pol* fueron menos confiables que aquellos del árbol *gag*, los prototipos de MV y AEC fueron agrupados junto a las secuencias brasileñas analizadas de ovejas y cabras respectivamente. Fue encontrada una correlación entre el virus y las especies de pequeños rumiantes de origen, de igual forma esta correlación fue encontrada por Valas *et al.*, (2000), quienes analizaron el gen *env* de los LVPR franceses aislados de cabras.

En la figura 21 el alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen *gag* de algunos LVPR, se encuentra que la mayor región de homología corresponde a los aminoácidos 132-146 de la secuencia de M33677. Aunque las regiones de mayor homología están conservadas entre los lentivirus; las secuencias analizadas están menos conservadas de lo esperado. La región de mayor conservación muestra claras diferencias entre las cepas de AEC y MV. Esta región tal vez pueda indicar alguna especificidad de especie (Huang y Martin, 1997).

Se ha descrito que la infección de cabras con los subtipos A3 o A4 ha sido asociada con el contacto con ovejas, las cuales también tienen este mismo subtipo, lo cual indica la transmisión entre especies (Pasick 1998; Shah *et al.*, 2004 (b)).

En el trabajo: Análisis filogenético y la reclasificación de los LVPR basado en 104 nuevos aislados: Evidencia para regular la transmisión de oveja a cabra y la propagación mundial a través de comercio de animales de Shah *et al.*, (2004) (b) se demostró que los LVPR deben ser divididos en cuatro grupos de secuencias principales de la A a la D, los cuales difieren de 25% a 37% en sus secuencias *gag* y *pol*. El grupo A y B a su vez se subdividen en subtipos que difieren entre sí 25%-27%.

El grupo A contiene al menos siete subtipos, de A1 a A7, y el grupo B contiene dos subtipos, B1 y B2. Se ha visto que los subtipos A3, A4, A6 y B2 han sido aislados tanto de ovejas como de cabras en algunos rebaños analizados donde cabras y ovejas estuvieron en contacto (Shah *et al.*, 2004 (b)).

En la figura 22 A, 22 B y 22 C se muestra la relación filogenética de los lentivirus de ovejas y cabras, deducidas a partir de la comparación de secuencias, en las secuencias *gag-pol* 1.8 kb, las secuencias *pol* de 1.2 kb y en el fragmento RT 279 contenido dentro de *gag-pol*.

Este estudio incrementa la información de secuencias en estos virus por la adición de 104 nuevos aislados, 78 secuencias a partir de un fragmento de 1.8 kb *gag-pol*, y 72 nuevas secuencias de un fragmento de 1.2 kb de *pol*. Con esta nueva información, se ha hecho posible hacer más refinados análisis de las relaciones filogenéticas y hacer estudios epidemiológicos moleculares.

Los árboles filogenéticos de las figuras 22 A, 22 B y 22 C indican que algunas cepas de LVPR no pueden ser clasificadas en el nivel de sólo grupos o subgrupos, como fue el caso del sistema de agrupamiento I-VI propuesto cinco años antes por Zanoni (1998), porque los diferentes grupos no son equidistantes. El grupo V por ejemplo, está más relacionado con el grupo IV que con los grupos I, II, III o VI, y los grupos I, II y VI están más estrechamente relacionados entre ellos que con el grupo III. Es necesario sobreponer grupos de secuencias de una más alta jerarquía por medio de las cuales las diferentes ramas puedan ser clasificadas en una relación filogenética que satisfaga el criterio de secuencia equidistante entre los subgrupo de un determinado grupo.

Este trabajo confirmó la conclusión de Mwaengo *et al.*, (1997) donde encontró que los aislados norteamericanos están más estrechamente relacionados a MV que a AEC.

Los virus del sur de Francia clasificados en los subtipos A6 y B2, son encontrados tanto en cabras como en ovejas, presentando una evidencia de transmisión entre especies (Leroux *et al.*, 1997), se deja abierta la posibilidad si esto fue una repetida y continua transmisión entre especies o solo fue debido a un único evento ocurrido en el pasado. Mas aún la dirección de la transmisión no es clara.

En el análisis filogenético del LVPR subtipo B1 en hatos mixtos: Evidencia de transmisión natural de cabras hacia ovejas de Pisoni *et al.*, (2005), un análisis filogenético del LVPR subtipo B1, muestra que este cruza la barrera entre especies bajo condiciones de campo a través del contacto directo entre animales adultos. Esto lleva a pensar que los programas de control no deben estar basados solo hacia una sola especie, si no de forma conjunta hacia ovinos y caprinos (Pisoni *et al.*, 2005).

En la figura 23 se muestra un árbol basado en LVPR del subtipo B1 de tres diferentes granjas con hatos mixtos, este muestra la relación filogenética de los lentivirus de cabras y ovejas.

Aunque se ha visto que los LVPR pueden ser transmitidos de forma experimental (Banks *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1985), la transmisión natural de LVPR subtipo B2 entre especies no ha sido documentada directamente, sugiriendo que este subtipo tiene un gran potencial de especificidad. En este estudio hecho por Pisoni *et al.*, (2005) se analizaron filogenéticamente virus a partir de cabras y ovejas que se encontraban en el mismo hato y estaban expuestas a la infección de forma natural. Se presenta en este trabajo la primera evidencia directa de que LVPR del subtipo B1 son transmitidos de cabras a ovejas por medio de una infección natural de tipo horizontal entre animales adultos.

En la caracterización molecular y estudio filogenético de las secuencias virales de MV y AEC en ovejas y cabras de España, trabajo hecho por Reina (2006), las secuencias españolas de ovejas y cabras estuvieron más cerca de secuencias de prototipos LVPR ovinos como EV1, SA-OMVV y KV1514 que de las secuencias prototipos de LVPR caprinos, como CAEV-Co y CAEV1GA. Esto confirma que la proximidad genética de LVPR puede ser independiente de la especie hospedera (Reina 2006).

En la figura 24 se muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen *pol* de 1.2 kb correspondiente a las regiones *pol*-dUTPasa, y *pol*-integrasa de LVPR. Un alto grado de conservación en la región dUTPasa fue encontrada entre los LVPR españoles estudiados y las secuencias de referencia. De forma similar, hubo un alto nivel de conservación del motivo HHCC *Zinc finger motif* en la región integrasa. Este motivo (dos residuos H y dos C) fue similar a los presentados en otras integrasas retrovirales (Brown, 1997); así como algunos factores de transcripción (Laity *et al.*, 2001); o la proteína ZAP antiviral que cubre el ARNm viral (Guo *et al.*, 2004). Los aminoácidos W, D T y S, también fueron conservados en los sitios activos de la integrasa, entre las secuencias españolas, no sólo las incluidas en el estudio de Reina *et al.*, (2006), sino también en trabajos previos como el de Grego *et al.*, (2002).

En la figura 25 se muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen *gag*-p25 de LVPR, aquí también hubo regiones altamente conservadas en la mayoría de los LVPR ovinos y parte de los caprinos. Estas fueron identificadas con el epítipo inmunodominante, responsables de la reactividad cruzada entre los anticuerpos contra la proteína p25 (Rosati *et al.*, 1999).

En la figura 26 donde se muestra un alineamiento de secuencias de la región LTR de LVPR, se encontró una gran heterogeneidad genómica.

En los filogramas 27 A, 27 B, 27 C y 27 D correspondientes a las regiones analizadas *pol*, *gag-p25* y LTR, presentaron una topología compatible. Esto mostró que las secuencias de LVPR españoles tanto caprinos como ovinos pertenecían a los grupos filogenéticos A o D, y estaban mas cerca de los prototipos ovinos (grupo A1) que a los prototipos caprinos (grupos B o C) correspondientes a la clasificación de Shah *et al.*, (2004) (b).

En el análisis filogenético de la región *gag* que codifica la proteína de matriz de LVPR (de la cual existe poca información), se hizo un análisis comparativo y de aplicaciones epidemiológicas moleculares, hecho por Pisoni *et al.*, (2006), los resultados mostraron que los aislados italianos están mas estrechamente relacionados al prototipo CAEV-CO, más que con cualquiera de las cepas prototipos de MV como se muestra en la figura 28. Las secuencias aisladas de LVPR fueron analizadas comparandolas con todas las secuencias de LVPR disponibles tomadas de las bases de datos, y pueden ser divididas en dos: aislados parecidos a AEC y aislados parecidos a MV. En este trabajo se sugiere un origen común de los LVPR, posiblemente relacionado a la introducción de cabras infectadas en una población seronegativa (Pisoni *et al.*, 2006). Para los virus pertenecientes al subtipo B2 (de la clasificación hecha por Shah *et al.*, 2004) aislados de poblaciones de ovejas naturalmente infectadas en Europa, se ha encontrado que están más estrechamente relacionados a AEC que a MV, esto es sugerido por el análisis hecho a varias de las secuencias parciales de nucleótidos. Este resultado tal vez indicaría un virus ancestral parecido a AEC presente en las ovejas y que ha sido recientemente esparcido en poblaciones de cabras. (Pisoni *et al.*, 2006).

El estudio hecho por Pisoni *et al.*, añadiendo 52 nuevas secuencias de la región que codifica la proteína de matriz, además de dos de origen italiano (Rosati *et al.*, 1999), que ya se encuentran en GenBank.

Aunque eventos de transmisión de LVPR (de ovejas hacia cabras y viceversa) han sido reportados en los análisis de secuencias en Europa (Leroux *et al.*, 1997; Shah *et al.*, 2004), así como en Italia (Grego *et al.*, 2002), en este trabajo no se encontraron secuencia parecidas a MV, indicando que las características de las granjas monitoreadas de manejo intensivo no existía contacto con ovejas, excluyendo la posibilidad de difusión de MV en hatos de cabras lecheras.

En la compartimentalización de LVPR entre sangre y calostro de cabras infectadas de Pisoni *et al.*, (2007), se presentó un análisis filogenético que se realizó de forma paralela entre sangre y calostro, donde se demostró la diferencia entre secuencias virales en el gen *env* en los sitios analizados, elucidando la relación entre la evolución genética de LVPR en sitios anatómico específicos y las propiedades biológicas de las secuencias del gen *env* (Pisoni *et al.*, 2007).

Lo cual se mostró en las figuras 29 A, 29 B, 29 C y 29 D de los árboles filogenéticos de la envoltura de los clones de LVPR obtenidos de sangre y calostro.

Macrófagos infectados están presentes de forma abundante tanto en calostro como en leche, considerado como una vía de transmisión de LVPR descrito en los trabajos de Radostis *et al.*, (2000) Preziuso *et al.*, (2004) y Peterhans *et al.*, (2004).

La investigación de los genotipos virales en varios compartimentos tal vez revele la presencia en la glándula mamaria de distintos virus particularmente adaptados a la transmisión lactogénica. En este estudio hecho por Pisoni *et al.*, (2007) se observó una importante diferencia en la carga viral en el parto en el compartimento sanguíneo entre las diferentes cabras. Un animal en particular (cabra 13) tenía una carga viral 100 veces más alta que los otros tres animales. Estas diferencias también fueron observadas por Ravazzolo *et al.*, (2006), quien mostró que cabras experimentalmente infectadas, exhibían diferentes cargas virales, posiblemente debido al componente genético de los animales en la eficacia de su respuesta inmune.

También se encontró una importante diferencia en la carga proviral entre sangre y calostro, que junto con las investigaciones de Ravazzolo *et al.*, (2006) se demuestra que la glándula mamaria es un sitio privilegiado para la replicación viral *in vivo* y para la transmisión viral.

Los resultados obtenidos, sugieren que las secuencias de LVPR diferentes entre sangre y calostro implica que puede haber algún grado de replicación independiente y/o evolución, como es propuesto para el caso del SIDA descrito por Zhang *et al.*, (2002).

En el estudio hecho sobre la transmisión natural y análisis comparativo de LVPR en las poblaciones de oveja y cabras Gjerset *et al.*, (2007), muestra que los genomas de LVPR, tal vez provean pistas importantes en la habilidad de estos para adaptarse al ambiente y al hospedero. En este trabajo se encontró que las infecciones con LVPR son más prevalentes en los caprinos. Esto es consistente con estudios previos de 80%-90% de seroprevalencia en las cabras noruegas en el trabajo descrito por Nord *et al.*, (1998). Este estudio muestra que LVPR noruegos derivados de cabras y ovejas en hatos mixtos, se encuentran distribuidos en el grupo C, el cual es caracterizado por tener un origen principalmente caprino, mientras que los aislados derivados de ovejas, a partir de hatos consistentes sólo en ovejas estuvieron dentro del grupo A.

En la figura 30 A y 30 B donde se muestra un árbol sin raíz basado en secuencias del gen *pol* de los LVPR, y un árbol sin raíz basado en secuencia del gen *env* igualmente de LVPR, se observa los valores genéticos de distancia y la ausencia de bifurcación entre las secuencias de virus del grupo C, esto sugiere ser característico de una evolución molecular en proceso y una mayor distancia del ancestro común.

La evidencia de infección cruzada esta bien documentada por autores como Castro *et al.*, (1999), Grego *et al.*, (2002), Pisoni *et al.*, (2005), Rolland *et al.*, (2002), Shah *et al.*, (2004) etc., lo que muestra en conclusión que tanto ovejas como cabras dentro de hatos mixtos pueden infectarse con una variante de LVPR con propiedades similares a las pertenecientes al grupo C que es caracterizado como virus parecidos a AEC. En este estudio se propuso una infección de cabra a oveja, con una mayor seroprevalencia entre los caprinos.

Otro trabajo hecho por Gjerset *et al.*, (2009) sobre el Impacto de la transmisión natural oveja-cabra en la detección y control de la infección con LVPR pertenecientes al grupo C, en la figura 31 se muestra un árbol filogenético basado en una secuencia del nucleótido 437 del gen *gag* que codifica para la proteína de matriz basado en 46 secuencias de LVPR, las secuencias tomadas de ovejas y cabras muestran un agrupado intra-hatos.

En la figura 32 se muestra un alineamiento de secuencias correspondientes al residuo 19-156 de la proteína de matriz de LVPR, el cual mostró muchas regiones con motivos conservados, y una región altamente variable en la parte C terminal.

Este estudio confirma la distribución dominante de LVPR genogrupo C en las ovejas noruegas y las poblaciones caprinas, y la infección interespecies.

Las diferentes estrategias de control para AEC y MV son factores importantes que afectan la diseminación de la infección. Este trabajo se considera el consumo de leche y calostro como la principal vía de infección, aunque se ha descrito que incluso compartir pastizales, es una causa importante para la transmisión de LVPR.

## 25.- CONCLUSIONES

Por medio de la bioinformática y la filogenética se puede llegar a conocer como está conformado el genoma de los LVPR, cual es la relación entre los subtipos existentes, así como la relación que tienen con el hospedero.

El análisis filogenético es una herramienta utilizada para comparar información acerca de los LVPR. La aplicación del análisis filogenético tanto a las secuencias de los genes de AEC como a las de MV es importante para estudios epidemiológicos de las infecciones con LVPR, y para estudiar potenciales diferencias y/o similitudes entre la virulencia que circula entre las cepas existentes. Por medio del estudio de los genomas lentivirales tal vez se muestren pistas importantes en su habilidad para adaptarse a los hospederos y al ambiente.

Los LVPR son responsables de pérdidas económicas en las explotaciones, aunque los efectos económicos han sido pobremente estudiados, además de ser importantes para la salud de los animales, es por esto que un mejor entendimiento del mecanismo viral de los LVPR lleva a un mejor control de la enfermedad, y su posible erradicación.

En trabajos publicados, la transmisión y distribución de LVPR han demostrado ser muy compleja, no tan específica de especies como se pensaba anteriormente. En estos se observa el poder de los retrovirus para mutar de forma muy rápida., lo que hace suponer que otros subtipos de los LVPR podrían aparecer en el futuro, aunados a los que ahora existen, lo cual puede tener un impacto en el control y erradicación de la enfermedad. Aunque los eventos de transmisión entre especies de forma natural tal vez sean infrecuentes, estos deben ocurrir regularmente ya que verdaderos eventos excepcionales no serían aceptados en estadística para trabajos de investigación científica. Es por esto que el contacto directo entre cabras y ovejas representa un verdadero riesgo en la transmisión viral de LVPR, se recomienda que para tener un control sobre los animales y evitar la diseminación de LVPR, debe hacerse una serología anual de todos los animales, así como separar a las especies.

Finalmente con los conocimientos obtenidos a partir de la filogenia se podrá implementar en un futuro medidas sobre el combate y erradicación de determinada patología en un hato de forma más eficaz y más exacta, ya que se sabrá que parte del genoma se debe atacar para eliminar a un determinado virus u organismo, y conociendo esto, tal vez se puedan crear medicamentos contra LVPR que ayuden a combatir la infección en los animales.

## 26.- BIBLIOGRAFÍA

Achtman M. A phylogenetic perspective on molecular epidemiology. Academia Press. 2001;1-23.

Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR. Transmisión and control of caprine arthritis-encephalitis virus. Am. J. Vet. Res. 1983;44;1670-1675.

Aldous D. Probability distributions on cladograms, in: Discrete Random Structures, eds. D. J. Aldous and R. Pemantle, Springer-Verlag, IMA Vol. In Mathematics and its Applications 1995;76;1-18.

Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Guiguen G, Larrat M, Pellerin JL, Roux C, Chebloune Y. Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus. Virology 2006;353;307-315.

Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Pellerin JL, Guiguen F, Cherel Y, Chatagnon G, Bouzar AB, Chebloune Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. Theriogenology 2008;69;408-415.

Al-Qudah K, Al-Majali AM, Ismail ZB. Epidemiological studies on caprine arthritis encephalitis virus infection in Jordan. Small Ruminant Research 2006;66;181-186.

Altman RB. Guide to bioinformatics at Stanford University. 2006. <http://www-helix.stanford.edu/people/altman/bioinformatics.html>

Amorena B, Reina R, de Andrés X, Glaria I, Crespo H, Ramírez H, Jáuregui P, San Román B, Grilló MJ, de Andrés D. MAEDI VISNA Experiencias de control de la enfermedad mediante aplicación de vacunas. Tierras 2008;147;32-39.

Asante-Appiah E, Skalka AM. Molecular mechanism in retrovirus DNA integration. Antiviral Research 1997;36;139-156.

Banks KL, Adams DS, McGuire TC, Carlson J. Experimental infection of sheep by caprine arthritis–encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *American Journal of Veterinary Research* 1983;44;2307–2311.

Becker Y, Hadar J. *Maedi-visna and related diseases*. Kluwer Academia Publishers. United States of America 1990.

Benavides J, García-Pariente C, Ferreras MC, Fuertes M, García-Marín JF, Pérez V. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of maedi-visna in 4- and 6- month-old lambs. *The Veterinary Journal* 2007;174;655-658.

Bertoni G. Recent Advances In Goat Diseases. *Internacional Veterinary Information* 2007; A0902.0707.

Bisecas E, Preziuso S, Bulgin M, DeMartini JC. Ovine Lentivirus-associated Leucomyelitis in Naturally Infected NET American Sheep. *J. Comp. Path.* 2005;132;107-116.

Blacklaws BA, Berriatua E, Tortsteinsdottir S, Watt N J, de Andres D, Klein D, Harkiss GD. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 2004;101;199-208.

Boris-Lawrie KA, Temin HM. Recent advances in retrovirus vectors technology. *Current Opinion In Genetics And Development* 1993;3;102-109.

Brown PO. Integration, In: Coffin JM, Varmus HE (Eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1997;161-203.

Callan RJ, Van Metre DC. Viral diseases of ruminant nervous system. *Vet. Clin. Food Anim.* 2004;20;327-362.

Campbell RSF, Robinson WF. The comparative pathology of the lentiviruses. *J. Comp. Path.* 1998;119;333-395.

Castro RS, Greenland T, Leite RC, Gouveia A, Mornex JF, Cordier G. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentivirus indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis and visna-maedi virus. *J. Gen. Virol.* 1999;80:1583-1589.

Cates S. Phylogenetic trees. The Connexions Project and Creative Commons Atributions License 2006.

Contreras A, Corrales JC. Artritis encefalitis caprina II. *Ovis* 2003;88:11-13.

Chebloune Y, Sheffer D, Karr BM, Stephens E, Narayan O. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* 1996;222:21-30.

Christodoulopoulos G. Maedi-visna: clinical review and short reference on the disease status in the mediterranean countries. *Small Ruminant Research.* 2006;62:47-53.

Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Jackson TA. Intrauterine transmisión of ovine progressive pneumonia virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1981;188:1795-1797.

Daltabuit M. Tesis doctoral, desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el estudio de la transmisión calostrual y horizontal del virus maedi-visna (VMV) en ovino. Universidad De Zaragoza, Facultad De Veterinaria, Departamento De Patología Animal 2005.

De Andrés D, Klein D, Watt NJ, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Blacklaws BA, Harkiss GD. Diagnostic test for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 2005;107:49-62.

De la Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ, De Martín JC. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am. J. Vet. Res.* 1996;57:684-688.

Denner J. Transspecies transmission of retroviruses: new cases. *Virology* 2007;369:229-233.

Demirov DG, Freed OE. Retrovirus budding. *Virus Research* 2004;106:87-102.

Dukes TW, Greig AS, Corner AH. Maedi visna in canadian sheep. *Can. J. Com. Med.* 1979;43;313-320.

Dunham SP, Graham. E. Retroviral infection of small animals. *Vet Clin Small Anim* 2008;38;879-901.

Durbin, R, Eddy, SR., Krogh, A, Mitchison, GJ. *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids.* Cambridge University Press, Cambridge UK 1998.

East NE, Rowe JD, Dahlberg JE, Theilen GH, Pedersen NC. Modes of transmiión of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Ruminant Research* 1993;10;251-262.

Felsenstein J. *Inferring phylogenies.* Sinauer Associates. *Am J Hum Genet.* 2004;74;1074.

Germain K, Valas S. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope sbtypes in naturally infected French sheep. *Virus Research* 2006;120;156-162.

Gjerset B, Jonassen CM, Rimstad E. Natural transmission and comparative análisis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Virus Research* 2007;125;153-161.

Gjerset B, Rimstad E, Teige J, Soetaert K, Jonassen CM. Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections. *Veterinary Microbiology* 2009;135;231-238.

Grego E, Profiti M, Giammarioli M, Gianni L, Rutili D, Woodall C, Rosati S. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodomanant epitope of capsid antigen and effects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002;9;828-832.

Grego E, Bertolotti L, Carroza ML, Profiti M, Mazzei M, Tolari F, Rosati S. Genetic and antigenic characterization of the matriz protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 2005;106;179-185.

Groner B, Hynes NE. Long terminal repeats provide regulatory signals at the end of retroviral genes. Elsevier 1982;376;400-403.

Guo X, Carroll JW, Macdonald MR, Goff SP, Gao G. The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. J. Virol. 2004;78;12781-12787.

Hall BG, Easy trees? – Review of “phylogenetic trees made easy: a how-to manual for molecular biologist”. Molecular Phylogenetics And Evolution 2003;27;168-171.

Hall BG, Barlow M. Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. Annals of Epidemiology 2006;16(3);157-169.

Hernández Valdemar EJ. Bioinformática: una nueva área de oportunidad. Science Biotechnology 2008;1-9.

Herrman-Hoesing LM, Palmer GH, Knowles DP. Evidence of proviral clearance following postpartum transmisión of an ovine lentivirus. Virology 2007;362;226-234.

Hillis DM. Phylogenetic analysis. Current Biology 1997;7;129-131.

Huang M, Martin MA. Incorporation of Pr160(gag-pol) into virus particles requires the presence of both the major homology region and adjacent C-terminal capsid sequences within the Gag-Pol polyprotein J. Virol., 1997;06;4472-4478

Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. Science 2001;294;2310-2314.

Karr BM, Chebloune Y, Leung K, Narayan O. Genetic Characterization of Two Distinct North American Ovine Lentiviruses and Their Possible Origin from Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. Virology 1996;225;1-10.

Keen JE, Hungerford LL, Littledike ET, Wittum TE, Kwang J. Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity. Preventive Veterinary Medicine 1997;30;155-169.

Kim FJ, Batín J-L, Manel N, Sitbon M. Emerge of vertebrate retroviruses and envelope capture. *Virology* 2004;318;183-191.

Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insight into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol* 2001;11;39-46.

Lehner T, Hussain L, Wilson J, Chapman M. Mucosal transmission of HIV. *Nature*. 1991;353(6346):709.

Leroux C, Chastang J, Greenland T, Mornex JF. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses : existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives of Virology* 1997;142;1125–1137.

Leroux C, Mornex JF. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small Ruminant Research* 2008;76;68-76.

Martin WB, Respiratory infections of sheep. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1996;19;171-179.

Martin WB, Aitken ID. Enfermedades de la oveja. Segunda edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza España 2002;225-227.

Mayr E. "What is a Species, and What is Not?", en *Philosophy of Science* 1996;63;262-277

Morrison DA. Phylogenetic tree building. *Internacional Journal For Parasitology* 1996;26;589-617.

Mselli-Lakhal L, Guiguen F, Greenland T, Mornex J-F, Chebloune Y. In vitro cross-species infections using a caprine arthritis encephalitis lentivirus carrying the GFP marker gene. *Journal of Virology Methods* 2007;143;11-15.

Murphy FA. Veterinary virology. Third edition. Academia Press. United Status of America 1999;363-369.

Mwaengo DM, Grant RF, De Martín JC, Carlson JO. Envelope glycoprotein nucleotide sequence and genetic characterization of North American ovine lentiviruses. *Virology* 1997;238:135-144.

Nord K, Loken T, Orten A. Control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in three Norwegian goat herds. *Small Ruminant Research* 1998;28:109-114.

Pasick J. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. Canadian Food Inspection Agency, National for Foreign Animal Disease 1998.

Peterhans E, Greenland T, Badiola J, Harkiss G, Bertoni G, Amorena B, Eliasiewicz M, Juste RA, Krassnig R, Lafont JP, Lenihan P, Petursson G, Pritchard G, Thorley J, Vitu C, Mornex JF, Pepin M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research* 2004;35:275-274.

Peterson K, Brinkhof J, Houwers DJ, Colenbrander B, Gadella BM. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 2008;69:433-442.

Pisoni G, Quasso A, Moroni P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 2005;339:147-152.

Pisoni G, Bertoni G, Boettcher P, Ponti W, Moroni P. Phylogenetic analysis of the gag region encoding the matrix protein of small ruminant lentiviruses: Comparative analysis and molecular epidemiological applications. *Virus Research* 2006;116:159-167.

Pisoni G, Giuseppe B, Puricelli M, Maccalli M, Moroni P. Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *Journal of Virology* 2007;81:4948-4955. (a)

Pisoni G, Moroni P, Turin L, Bertoni G. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology* 2007;369:119-130. (b)

Ponti W, Paape M, Bronzo V, Pisoni G, Pollera C, Moroni P. Phenotypic alteration of blood and milk leukocytes in goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Small Ruminant Research* 2008;78;176-180.

Prezioso S, Renzoni G, Allen TE, Taccini E, Rossi G, DeMartini JC, Braca G. Colostral transmission of maedi visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Veterinary Microbiology* 2004;104;157-164.

Radostis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. *Veterinary medicine*. 2000, 9th ed. Philadelphia (PA) WB Saunders.

Ravazzolo AP, Reischak D, Petershans E. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from southern Brazil. *Virus Research* 2001;117-123.

Ravazzolo AP, Nenci C, Vogt HR, Waldvogel A, Obexer-Ruff G, Peterhans E, Bertoni G. Viral load, organ distribution, histopathological lesion, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*. 2006;350;116-127.

Reina R, Berriatua E, Juján L, Juste R, Sánchez A, de Andres D, Amorena B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *The Veterinary Journal* 2009;182;7-31.

Reina R, Mora MI, Glaria I, García I, Solano C, Luján L, Badiola JJ, Contreras A, Berriatua E, Juste R, Mamoun RZ, Rolland M, Amorena B, de Andrés D. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Research* 2006;121;189-198.

Rodríguez Y, Tamayo R. Un acercamiento a los datos censurados y el bootstrap. *Comunicaciones en Estadística* 2008;1;1.

Rolland M, Money J, Valas S, Perrin G, Mamoun RZ. Characterization of an Irish caprine lentivirus strain-SRLV phylogeny revisited. *Virus Res*. 2002;85;29-39.

Ronquist F. Molecular phylogenetics for dummies – Review of “phylogenetic trees made easy: a how – to manual for molecular biologist” By Barry G. Hall. *Molecular Phylogenetics And Evolution* 2003;27;163-164.

Rosati S, Mannelli A, Merlo T, Ponti N. Characterization of immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res* 1999;61;177-183.

Schnorr KL, Pearson LD. Intestinal absorption of maternal leukocytes by newborn lambs. *J Reprod Immunol* 1984;6:329-337

Shah C, Huder JB, Schönmann M., Mühlherr J, Lutz H, Schüpbach J. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *Journal Of Virology* 2004;78;7518-7522. (a)

Shah C, Böni J, Huder JB, Vogt H-R, Mühlherr J, Zanoni R, Miserez R, Lutz H, Schüpbach J. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology* 2004;319;12-26. (b)

Sigurdsson B, Palsson P, Grimsson H. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1957;16;389-403.

Smith VW, Dickson J, Coackley W, Carman H. Response of merino sheep to inoculation with a caprine retrovirus. *Veterinary Record* 1985;117;61–63.

Straub OC. Maedi-visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases* 2004;27;1-5.

Valas S, Benoti C, Guionaud C, Perrin G, Mamoun RZ. North American and French Caprine Arthritis-Encephalitis Viruses Emerge from Ovine Maedi-Visna Viruses. *Virology* 1997;237;307-318.

Valas S, Benoit C, Baudry C, Perrin G, Mamoun RZ. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *J Virol* 2000;74:6178–6185.

Woese C. "On the evolution of cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8742-7.

Zanoni RG, Nauta I M, Kuhnert P, Pauli U, Pohl B, Peterhans E. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Veterinary Microbiology* 1992;33:341–351.

Zanoni RG. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus. *Journal of General Virology* 1998;79:1951-1961.

Zhang GG, Rodrigues L, Rovinski B, White KA. Production of HIV-p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol Biotechnol* 2002;20:131-136.

### **Citas electronicas**

Büchen-Osmond C. "The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses" Jul., 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/> (Agosto 2008).

Büchen-Osmond C. "Caprine arthritis encephalitis virus In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4" Abr., 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/> (Agosto 2008). (a)

Büchen-Osmond C. "Visna/maedi virus In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4" Abr., 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/> (Agosto 2008). (b)

Kim J, Warnow T. "Tutorial on phylogenetic tree estimation" Jun., 1999. <http://kim.bio.upenn.edu/~jkim/media/ISMBtutorial.pdf> (Sep 2008).

Lopez R. "What is bioinformatics". [http://www.ebi.ac.uk/2can/bioinformatics/bioinf\\_what\\_1.html](http://www.ebi.ac.uk/2can/bioinformatics/bioinf_what_1.html). (Mayo 2009).

Lee WW. "Core statistics for bioinformatics" 2003. <http://chagall.med.cornell.edu/BioinfoCourse/SuggestedReading.html>. (Octubre 2009).

Porter S. Phylogenetic trees. Sep. 2007 <http://www.geospiza.com> Geospiza 2007. (Enero 2009).

Rodríguez EA. “Introducción a la bioinformática”. CINVESTAV-Tamaulipas. Jun 2009. [www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion01.pdf](http://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion01.pdf). (Agosto 2009).

Vinuesa P. “Conceptos básicos de evolución molecular y filogenética. Genómica Evolutiva I” Licenciatura de Ciencias Genómicas. Ago., 2009. <http://www.ccg.unam.mx/> (Octubre 2009)

Wikipedia. Molecular Phylogenetics, URL: [http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular\\_phylogeny](http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_phylogeny), Enero-2009.