



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Generación y caracterización de la proteína p25 del Lentivirus de pequeños
rumiantes (LvPR) expresada en *Escherichia coli*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MVZ. Blanca Valladares Riveroll

TUTOR PRINCIPAL DE LA TESIS:

MC. Enrique Herrera López
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la
Producción y Salud Animal

COMITÉ TUTOR:

Dr. Hugo Ramírez Álvarez
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la
Producción y Salud Animal

Dr. Andrés E. Ducoing Watty
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, los Doctores Enrique Herrera López, Hugo Ramírez Álvarez y Andrés Ducoing Watty, por sus conocimientos, paciencia y motivación.

A Luis por tus enseñanzas, amistad y apoyo durante todo el trabajo, no hubiera podido concluir esto sin tu orientación y consejos.

Al Dr. Efrén por brindarme la confianza y la oportunidad de realizar este proyecto. Gracias por su apoyo y amistad.

Agradezco el apoyo invaluable de los miembros de mi jurado: Dra. Marcela Figueroa Ochoa, Dr. Humberto Ramírez Mendoza y Dr. Francisco Rivera Benítez, por haber contribuido a enriquecer este trabajo.

A los Doctores, compañeros y amigos del INIFAP: Dra. Gabriela Palomares, Dr. Atalo Martínez, Dr. Víctor Tenorio, Dra. Laura Jaramillo, Isa, José Luis, Caty, Aldo, Magda, Ana por su orientación, ayuda, consejos y amistad.

Agradezco especialmente al Dr. Daniel Martínez por brindarme tu apoyo y orientación en todo momento.

A Chio, Mayra, Citla, Sve, Beto, Angie, Pablo, Esteban y aquellos amigos que por falta de memoria y exceso de estrés he olvidado mencionar, gracias por su eterna amistad.

Gracias a la familia López Herrera, por estar incondicionalmente conmigo durante estos años, gracias por tanto apoyo y amor. A Beto por tanto amor, por nunca rendirte ante tremendo drama.

Gracias por encima de todo a mis padres y hermanas por su apoyo, comprensión y presencia.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVO GENERAL	26
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS	27
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	27
DISEÑO DE INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN <i>gag-p25</i> (CÁPSIDE)	27
EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE LÍQUIDO SINOVIAL	30
SÍNTESIS DE ADNc (ADN complementario) A PARTIR DEL ARN TOTAL	31
PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN <i>gag-p25</i> (CÁPSIDE)	32
PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR <i>gag-p25</i> (CÁPSIDE)	33
CLONACIÓN DE LA PROTEÍNA p25	33
EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO PARA LA EXPRESIÓN DE p25 MEDIANTE LISIS ALCALINA	35
SELECCIÓN DE PLÁSMIDOS	36
PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE PLÁSMIDOS	37
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p25	37
CURVA DE CRECIMIENTO	38

LISIS PROTÉICA	39
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	39
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	40
TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS	40
INMUNODETECCIÓN	41
PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LA PROTEÍNA p25-CÁPSIDE	42
7. RESULTADOS	43
RT-PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN GENÉTICA QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA p25-CÁPSIDE	43
CLONACIÓN DE LA PROTEÍNA p25	45
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p25	48
8. DISCUSIÓN	53
9. CONCLUSIONES	59
LITERATURA CITADA	60

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Esquema de la estructura de LvPR	9
Figura 2. Mapa genómico de LvPR	9
Figura 3. Homología del iniciador Gag-p25-1	28
Figura 4. Homología del iniciador Gag-p25-2	29
Figura 5. Constantes de la PCR para la amplificación de p25	33
Figura 6. Esquema del vector comercial Champion™ pET-SUMO Protein Expression System.....	34
Figura 7. Producto de amplificación correspondiente a la proteína p25	43
Figura 8. Electroferograma de la secuencia gag-p25	44
Figura 9. Homología de la amplificación presente en la PCR gag-p25	44
Figura 10. ADN plasmídico obtenido a partir de las colonias transformantes	45
Figura 11. Producto de amplificación correspondiente al inserto de p25	46
Figura 12. Productos de PCR correspondientes al inserto p25	46
Figura 13. Homología de la secuencia del ADN plasmídico	47
Figura 14. Análisis de dirección del marco de lectura para la proteína p25	48
Figura 15. Extractos proteicos de <i>E.coli</i> post-inducción	49
Figura 16. Proteínas extraídas teñidas con Rojo de Ponceau	49
Figura 17. Proteínas obtenidas en la inmunodetección	50
Figura 18. Obtención de proteínas después de la purificación	51
Figura 19. Secuencias de aminoácidos obtenidas en la LC-MS/MS	51
Figura 20. Homología de la proteína de 38 kDa obtenida a partir de la expresión en <i>E.coli</i>	52
Figura 21. Homología de la proteína de 32 kDa obtenida a partir de la expresión en <i>E.coli</i>	52

RESUMEN

VALLADARES RIVEROLL BLANCA. Generación y caracterización de la proteína p25 del Lentivirus de pequeños rumiantes, expresada en *Escherichia coli*. (Bajo la asesoría de MC. Enrique Herrera López, Dr. Hugo Ramírez Álvarez y Dr. Andrés E. Ducoing Watty).

El grupo de retrovirus que infectan a ovinos y caprinos es actualmente denominado como Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) y está conformado por dos lentivirus que presentan características estructurales similares y que genéticamente se encuentran muy relacionados, éstos son el virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) y el virus de Maedi-Visna (VMV). El diagnóstico serológico es comúnmente el método más usado para la detección de la infección por estos virus. Sin embargo, actualmente existe poca disponibilidad de pruebas serológicas en el país que permitan un monitoreo constante de los LvPR, por lo que es necesario evaluar alternativas de diagnóstico locales. El objetivo de este trabajo fue la obtención de una proteína recombinante viral (cápside, p25), candidata a ser utilizada como antígeno en el desarrollo de técnicas diagnósticas que permitan la identificación de LvPR que infectan a pequeños rumiantes en rebaños del país. Inicialmente, se amplificó la región genética de la proteína p25 del LvPR, a partir de una muestra de un animal infectado naturalmente y mediante la estandarización de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se obtuvo un producto de 667 pares de bases, correspondiente al marco de lectura abierto que codifica para la p25. Posteriormente, este fragmento fue insertado en un plásmido comercial y fue expresado en células de *Escherichia coli* (*E. coli*). En este trabajo, se logró la expresión de la proteína recombinante p25 y se determinó la inmunoreactividad de la misma por la técnica de Western blot. Finalmente, la corroboración de la proteína p25, se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas (LC-MS/MS).

Palabras clave: Lentivirus, proteína recombinante, cápside, clonación

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes

En 1974, la artritis encefalitis caprina (AEC) fue descrita por primera vez como una enfermedad crónica, caracterizada por una artritis progresiva en animales adultos y una encefalitis desmielinizante (leucoencefalomielitis) en animales jóvenes ^[1, 2]. El virus fue aislado a partir de la membrana sinovial de una cabra con artritis, en los Estados Unidos de América (EUA) en 1980 y denominado como virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) [Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV)] y en 1990 se llevó a cabo la caracterización completa del genoma viral ^[1, 3, 4].

El virus de la AEC se encuentra filogenéticamente relacionado con el virus de Maedi-Visna (VMV) [Maedi-Visna Virus (MVV)], el cual originalmente fue identificado en ovinos ^[1, 5]. Este virus fue introducido a Islandia a través de borregos Karakul importados de Alemania en 1940. Sin embargo, a través de diversos programas de control, la enfermedad y el virus fueron erradicados de ese país ^[1]. Los análisis filogenéticos de las secuencias de nucleótidos entre el virus de la artritis encefalitis caprina y el virus de Maedi-Visna han demostrado que son lentivirus similares y muy relacionados; por lo que actualmente son referidos como Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPRs) [Small Ruminant Lentivirus (SRLV)] ^[2, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

La transmisión interespecie de los LvPR (de ovinos a caprinos y viceversa) ya ha sido demostrada mediante estudios filogenéticos a partir de animales infectados de forma natural ^[7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. La infección se caracteriza por la persistencia del genoma viral en monocitos y macrófagos del hospedador. La mayoría de los ovinos y caprinos

infectados con LvPR no manifiestan la enfermedad clínica, sin embargo, permanecen infectados y son capaces de transmitir virus [17, 18, 19].

La enfermedad evoluciona de forma crónica, teniendo importancia económica debido a que causa la eliminación prematura de animales infectados, descenso en la producción de leche y calidad de la misma, baja de peso, disminución en la tasa de natalidad, porcentaje de fertilidad y número de crías por parto; además de limitar el comercio nacional e internacional [5, 6, 7, 8, 10, 11, 20, 21]. Los LvPRs tienen una distribución mundial, aunque presentan una mayor prevalencia e incidencia en países industrializados [18, 22].

Existe evidencia serológica que indica la infección por LvPR en rumiantes silvestres, tal es el caso del muflón, íbix y gamuza [7, 11, 23, 24]. No obstante, es difícil determinar la prevalencia en estas especies [11]. Asimismo, los estudios realizados en los genes virales de LTR y *gag* de estos rumiantes silvestres, determinaron que estos virus fueron similares al tipo AEC [7].

Diversos trabajos han demostrado que la producción de citocinas, el nivel de expresión de receptores para estas citocinas y algunos polimorfismos pueden afectar la patogénesis del virus y por tanto la diseminación de la enfermedad [11, 25]. En un estudio con ovinos, observaron que una delección en el gen CCR5 está asociada a una reducción en la carga proviral de las razas Rambouillet, Polipay y Columbia [25]. Asimismo, se identificó que el gen TMEM154 en las razas Dalsebred, Herdwick y Fells Rough, tiene un alta frecuencia de mutación, la cual está asociada a resistencia, demostrando que existe una alta proporción de polimorfismos en pequeños rumiantes que pueden estar relacionados a conferir resistencia a la infección por LVPRs [25, 26].

1.2 Artritis Encefalitis Caprina en México

En México, el primer reporte de la enfermedad se realizó en 1983, mediante un estudio serológico y posteriormente a través de un trabajo clínico-patológico en 1985, se confirmó su presencia en algunos rebaños del Estado de México y Guanajuato, en donde todos los animales positivos provenían de los Estados Unidos de América (EUA) [22, 27, 28, 29]. Por otro lado, la enfermedad en ovinos (Maedi-Visna) fue reconocida serológicamente por primera vez en 1983 y recientemente en 2005, sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado el aislamiento del virus en esta especie, por lo que aún es considerada una enfermedad exótica para México [10, 30, 31, 32, 33].

En 1984, se llevó a cabo un estudio epidemiológico a nivel mundial, en el cual se identificó a Canadá, Francia, Noruega, Suiza y EUA, como los cinco países con mayor seroprevalencia de AEC; donde la prevalencia obtenida para cada uno de ellos fue superior al 65%, mientras que en México, Perú, Fiji, Kenia, Gran Bretaña y Nueva Zelanda mostraron una prevalencia menor al 10%. Asimismo, se determinó que aquellos animales nativos o que no tuvieron contacto con animales importados fueron seronegativos [22].

Algunos trabajos serológicos realizados en 24 estados de los EUA, encontraron que del 31% hasta el 81% de los animales fueron seropositivos a AEC; indicando una amplia distribución de esta infección en este país [22, 27].

Por otra parte, el análisis de un brote de AEC en Kenia, originado por la introducción de un hato caprino infectado proveniente de los EUA, reveló que el 79.6% de los animales resultaron seropositivos y que más del 50% desarrollaron lesiones articulares [22, 27].

En 1985, a partir de muestras provenientes de 11 estados de la República Mexicana y usando la técnica de inmunodifusión en gel agar (IDGA), se reportó una prevalencia del

27.1% en cabras importadas o procedentes de los EUA, similar al brote en Kenia. En este estudio, los animales 'criollos' o 'nativos' fueron seronegativos [34].

Otro estudio realizado en 60 animales con signología clínica sugerente a la infección por AEC, provenientes de los estados de México, Guanajuato y Querétaro, resultaron seropositivos por la técnica de IDGA y además en dos de ellos se demostró la presencia del virus mediante estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos y microscopía electrónica; confirmando la presencia en caprinos de la enfermedad de AEC en México [18, 19].

Trabajos realizados en el estado de Yucatán, mostraron una prevalencia para la AEC del 3.6% en tres rebaños, todos los animales seropositivos provenían del estado de Campeche o de los EUA. La seroprevalencia únicamente se encontró en los animales importados; los animales 'nativos' no presentaron evidencia de la infección [29].

La frecuencia de animales infectados es mayor en explotaciones tecnificadas debido a que el semen, animales de reemplazo y embriones usados en los programas de mejoramiento genético, provienen de países o explotaciones con animales de alto valor genético en donde la enfermedad puede estar presente [29, 35]. Aunque en México predominan las explotaciones caprinas no tecnificadas, estas no están exentas de la AEC. Así lo demuestra un estudio seroepidemiológico realizado en el estado de San Luis Potosí, donde se encontró una seroprevalencia del 43% en rebaños tecnificados que cuentan con animales de alto valor genético, los cuales sirven de base para la mejora genética del ganado caprino en este estado [35].

El primer aislamiento de LvPR en México se notificó en 1999, a partir de dos cabras seropositivas al virus de AEC en la región norte del país. Mediante co-cultivos en células

de membrana sinovial y análisis con pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se confirmó el aislado viral ^[18, 36]. Sin embargo, es hasta el 2011, a partir de un caprino denominado FESC-752 perteneciente a un rebaño mixto (caprinos y ovinos) del centro del país, que se obtuvo la secuencia completa del virus y mediante construcciones filogenéticas se logró identificar y asignar el subtipo genético que infectaba a este rebaño, el cual correspondió al subtipo B1. Asimismo, con el análisis de la región *env*, se identificó una recombinación hipotética con secuencias de origen estadounidense y francés, lo cual, es compatible con los animales importados de ese rebaño; este trabajo corresponde a la primera caracterización genética de LvPR en el país ^[32].

Trabajos más recientes de seroprevalencia para la AEC en 14 municipios del centro del estado de Veracruz, revelaron una prevalencia general del 6%, 64% por municipio y del 22% por rebaño; demostrando una alta prevalencia y distribución en estas regiones. Asimismo, se identificaron como factores de riesgo, aquellos animales procedentes de los estados de Guanajuato y Querétaro ^[37].

En otro estudio serológico para detectar la presencia de LvPR en machos caprinos y ovinos de los estados de Querétaro, Guanajuato, Coahuila, Estado de México, Hidalgo y Puebla, se encontró un alto porcentaje de seroprevalencia a la infección por LvPR en los machos caprinos de todos los estados muestreados. Únicamente se encontraron ovinos machos positivos a LvPR en el estado de Hidalgo, con una seroprevalencia del 7.6%, en el resto de ellos no se reportó ningún ovino seropositivo a la infección ^[10].

A pesar de que los primeros reportes de la AEC en el país iniciaron en 1983; es hasta 1994, que el gobierno mexicano la declara como enfermedad enzoótica en México y de notificación obligatoria; con la finalidad de implementar reglas para la regulación de animales importados para los programas de mejoramiento genético ^[10, 29].

En el listado de enfermedades de notificación obligatoria del país, la AEC se encuentra en el grupo 3; este grupo está conformado por aquellas enfermedades que están presentes en el territorio nacional, consideradas como enzoóticas, pero que representan un riesgo epidemiológico, económico, de salud pública y comercialización menor. No obstante, son consideradas enfermedades de notificación mensual obligatoria ^[33].

Actualmente, la movilización de pequeños rumiantes entre regiones ha contribuido a la diseminación de la enfermedad en diversos países del mundo ^[11]. En México, las regulaciones existentes para la importación de animales vivos (o componentes biológicos, como el semen) que estén libres de infección por LvPR y que puedan usarse en programas de mejoramiento genético, continua sin ser establecido ^[18, 29, 32].

En algunos estados de la República Mexicana, la comercialización e importación de sementales es frecuente, lo cual representa un riesgo en la transmisión de LvPR ya que se ha reportado la presencia de ADN proviral en órganos sexuales y eyaculado de pequeños rumiantes ^[7, 11]. De esta forma, la detección de machos seropositivos a LvPR, juega un papel trascendental en el control de la enfermedad ya que el animal permanecerá infectado de forma persistente durante toda su vida productiva. Bajo este panorama, se vuelve necesario establecer programas de control en los machos utilizados como pie de cría, con el fin de evitar que sean fuente de diseminación de infecciones ^[10].

A pesar de que se ha demostrado la presencia de LvPR en el país, se han realizado pocos estudios que permitan conocer su situación zoonosaria en el territorio nacional; a la fecha, se ignora la prevalencia de la enfermedad en la mayoría de los estados dedicados a la producción caprina y ovina ^[18, 19].

1.3 Características del género *Lentivirus*

Los *Lentivirus* de Pequeños Rumiantes pertenecen a la familia *Retroviridae*. Esta familia comprende dos subfamilias la *Spumaretrovirinae* y *Orthoretrovirinae* [38, 39]. Esta última contiene seis géneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* y *Lentivirus*, al cual pertenecen los LvPR [1, 38, 39].

Los LvPR son virus envueltos de 80-100 nanómetros (nm) de diámetro aproximadamente, esféricos y con proyecciones en la superficie [1, 9, 38, 40]. Su genoma está formado por dos cadenas simples dimerizadas de ARN, no segmentadas, de polaridad positiva, unidas a una nucleoproteína [1, 38, 41, 42]. Cada uno de los extremos del genoma está compuesto por regiones largas repetidas (LTRs) y éstas a su vez se dividen en la región U3, R y U5. Estas regiones proveen señales requeridas para la integración del genoma viral en la célula y para el inicio de la transcripción [25, 38, 39, 43, 44].

Su envoltura contiene dos glicoproteínas virales, la proteína de superficie (SU) y la proteína transmembranal (TM). La cápside (CA) tiene forma cónica con un diámetro de 50-60 nm y una longitud de 100-120 nm, aproximadamente [38, 45]. La proteína de la cápside recubre a la nucleocápside (NC), al genoma y enzimas virales [45]. La proteína de matriz (MA) interactúa con las proteínas de la envoltura viral (SU y TM) brindándole estructura y estabilidad al virus (Figura 1) [1, 9, 38, 46, 47].

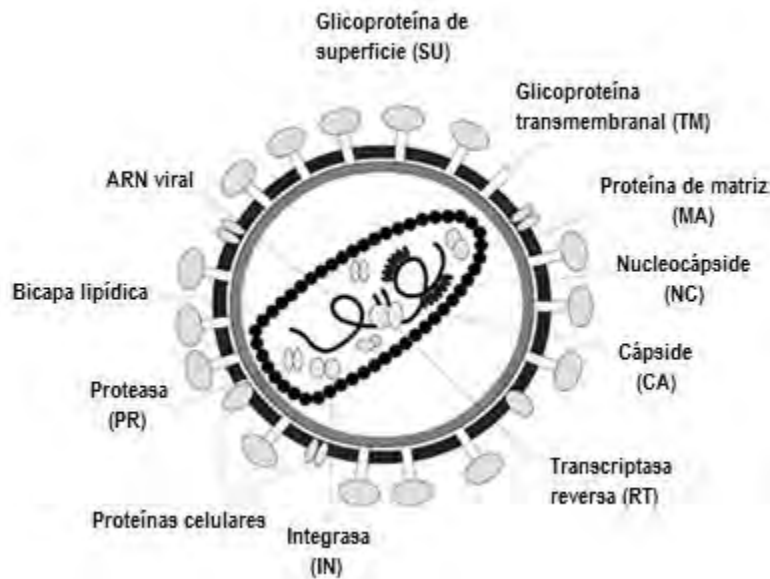


Figura 1. Esquema de la estructura morfológica de LvPR. Se observa el genoma y las proteínas que lo forman: SU, corresponde a la proteína de superficie; TM, a la proteína transmembranal; MA, a la proteína de matriz; NC, a la nucleocápside; CA, a la cápside; RT, a la transcriptasa reversa; PR, a la proteasa; IN, la integrasa y finalmente el genoma ARN. (Adaptado de Quérat y Vigne; 1999).

El genoma viral tiene un tamaño aproximado de 9.2 kilobases (Kb) y contiene tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*, así como tres genes reguladores: *vif*, *vpr-like* y *rev*. Entre los genes estructurales, el gen *gag* (antígeno específico de grupo) codifica para las proteínas cápside, matriz y nucleocápside [9, 38, 40,46]. El gen *pol* (polimerasa) codifica las enzimas virales, transcriptasa reversa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR) [18, 38, 41, 42, 44, 48]. Finalmente, el gen *env* (envoltura) codifica para las glicoproteínas de envoltura superficial (SU) y transmembranal (TM) (Figura 2) [18, 25, 38, 41, 44, 49].

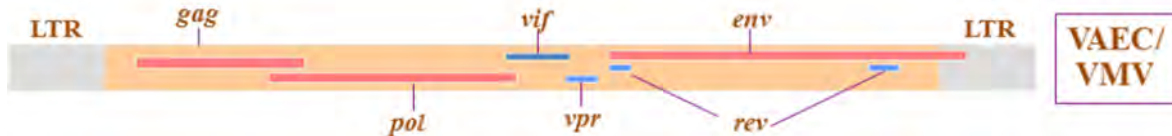


Figura 2. Mapa genómico de LvPR (Adaptado de Minardi *et al*, 2013).

La proteína de SU tiene un peso de 135 kilodaltones (KDa) para los LvPR, es responsable de reconocer al receptor, lo que permite la adhesión a las células blanco [1, 8, 38]. Se han realizado diversos estudios para identificar y caracterizar al receptor de LvPR, algunos de estos proponen a una glicoproteína asociada a la membrana que participa en la unión [50]. Otros mencionan a un complejo de tres proteínas de membrana de 15, 30 y 45 KDa, identificadas como proteínas de unión de MV [51]. Otros más, sugieren a algunas glicoproteínas asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) [52]. Incluso las moléculas CD4 y CXCR4 se han propuesto como co-receptores que facilitan la fusión de membranas [53, 54].

Recientemente, el receptor de manosa (RM) ha sido descrito en ovinos y se ha identificado como un receptor potencial para LvPR tipo ovino [55]. La presencia de este receptor ha sido asociado con la evolución de la enfermedad, en donde un aumento en la expresión de éste en los órganos blanco, se manifiesta con severas lesiones clínicas en infecciones con LvPR [56]. No obstante, ninguna de estas moléculas se ha establecido como único receptor de estos lentivirus [43].

La proteína TM tiene un peso aproximado de 46 KDa [1, 8]. Durante la interacción con los receptores celulares la proteína SU sufre un cambio de conformación que permite contactar un dominio de la proteína TM, dando como resultado la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática y con ello la liberación de la cápside en el citoplasma de la célula para iniciar el proceso de transcripción reversa e integración al genoma celular [1, 8, 38, 41, 42, 45, 57, 58, 59].

La proteína de CA tiene un peso de 25 KDa, su principal función es proteger y organizar el genoma viral para llevar a cabo el proceso de transcripción reversa, logrando una eficiente replicación del virus [1, 8, 39, 45].

La proteína de MA pesa 17 KDa [1, 8]. Se localiza en la parte interna de la envoltura viral. Mantiene la estructura de las proteínas de membrana (SU y TM) y participa en el ensamblaje viral para su liberación [39, 44, 60].

La replicación de los retrovirus requiere la síntesis de una doble cadena de ADN a partir del genoma ARN viral. Este proceso de transcripción reversa se lleva a cabo mediante la enzima RT [38]. La RT es un heterodímero (compuesto de 2 unidades diferentes): una subunidad grande de 66 KDa, con dominios de polimerasa y ARNsa H (ribonucleasa) y una pequeña de 51 KDa, la cual carece del dominio ARNsa, presentando únicamente actividad de polimerasa [1, 38, 39, 44, 45, 60].

La IN pesa 39 KDa y junto con algunos factores celulares participa en el proceso de integración del genoma viral dentro del genoma celular [1, 8, 61].

La PR es una proteína dimérica, formada por dos subunidades idénticas con un peso de 12 KDa [1, 39]. Tiene un sitio activo (conformado por residuos de aspartato) con pequeñas pestañas que permiten el acceso del sustrato a su sitio activo. La PR participa escindiendo los precursores de *gag* y *gag-pol* para generar proteínas maduras; esta proteólisis es necesaria para convertir al virión inmaduro en viriones maduros capaces de infectar [39, 62].

Dentro de los genes reguladores, la proteína *vif* (Factor de Infectividad Viral), funciona como antagonista de los factores celulares contra el virus, es decir, bloquea las proteínas inhibitoras de la célula (tales como, cistidinas desaminasas- APOBEC) permitiendo una eficiente replicación viral [2, 38].

La proteína *tat* en los LvPRs, originalmente se describió como un activador transcripcional [2]. Sin embargo, estudios recientes mostraron que esta proteína *tat* no tiene actividad transactivadora, por lo que difiere de la de los lentivirus en primates [44, 63]. No obstante, tiene una actividad similar a la proteína *vpr* del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), por lo que en los LvPR esta región se ha denominado como *vpr-like* [2, 25, 40, 63].

Finalmente, la proteína *rev* (regulador de la expresión de proteínas del virión) regula el transporte nuclear y la exportación del ARN mensajero (ARNm) viral del núcleo al citoplasma; también está involucrado en el proceso de splicing (corte y empalme) durante la traducción del ARN viral [2, 42, 44].

Las relaciones entre los lentivirus han sido investigadas mediante análisis filogenéticos. Recientemente, estudios basados en secuencias largas de ácidos nucleicos de los segmentos *gag-pol* (1.8 kb) y *pol* (1.2 kb), clasifican a los LvPRs en cinco grupos (A-E), los cuales difieren entre cada uno en un 25-37% [43, 49, 64, 65]. Los genotipos A, B y E son divididos a su vez en diferentes subtipos, estos difieren entre su secuencia en un 15-27% [43, 49, 65, 66].

El grupo A incluye aquellos prototipos aislados del ovino: SA-OMVV (Sudáfrica), EV1 (Escocia) y 1514 (Islandia) [5, 7, 49, 67, 68]. Este grupo consta de por lo menos 17 subtipos reconocidos (A1-A17) [43, 49, 64, 65, 66].

El grupo B, es menos complejo (genéticamente) que el A, contiene a los lentivirus prototipos aislados de caprinos, principalmente provenientes de EUA [49]. Este genotipo está dividido en 3 subtipos (B1-B3) [43, 49, 64, 69]. El grupo C comprende los aislados caprinos de Noruega (AF322109) [43, 49, 70]. El grupo D únicamente ha sido descrito en ovinos de Suiza (AY454295) y España (DQ632733) a partir de la secuencia de su gen *pol* [43, 49, 64, 71].

Finalmente, el grupo E está dividido en 2 subtipos y comprende los aislados provenientes del norte de Italia (EU10124; subtipo E1) y Cerdeña (GQ381130.1; subtipo E2) [43, 49, 65, 72].

Hasta la fecha, los genotipos B, C y los subtipos A1, A3-A6, A-9, A11-A13 han sido encontrados en ambas especies (ovinos y caprinos). El resto de los genotipos y subtipos únicamente han sido estudiados en una de las dos especies [5, 7, 43].

1.3.1 Transmisión

La principal ruta de transmisión de los LvPR es a través de la ingestión de calostro y/o leche de animales infectados con el virus [7, 11, 14, 18, 20, 25, 29, 34, 73, 74, 75, 76]. En el caso particular de LvPR de origen ovino, el contacto directo y prolongado con secreciones (específicamente, aerosoles), también representa una vía importante de transmisión, la cuál se ve favorecida comúnmente en sistemas intensivos debido a la alta población animal [11, 21, 25].

La transmisión intrauterina no ha sido estudiada a profundidad, no obstante, algunos reportes mencionan que aproximadamente el 10% de los fetos provenientes de hembras infectadas con LvPR, fueron positivos al virus mediante serología, histopatología y aislamiento viral [7, 11, 73, 77, 78]. De igual manera, se ha demostrado la presencia del virus en células del tracto genital en cabras [11, 79]. Asimismo, se ha identificado que las placentas de hembras positivas a LvPR, representan una fuente importante de infección [11, 80, 81]. Recientemente, al realizar una cinética de la infección por VAEC, se identificó la presencia de anticuerpos y partículas virales en cabritos recién nacidos sin calostro, demostrando que cabras infectadas con LvPR pueden transmitir el virus de forma intrauterina [82].

Se ha demostrado la presencia del virus en líquido seminal de animales infectados natural y experimentalmente [5, 7, 11, 83, 84, 85]. Usando semen infectado con LvPR, se logró detectar la presencia de anticuerpos contra el virus en aquellas cabras inseminadas con dicho eyaculado; esto confirma la participación del semen infectado como vía de transmisión viral [86].

Los LvPRs se consideraban virus específicos de especie, sin embargo, actualmente se sabe que pueden ser transmitidos entre caprinos y ovinos e incluso pueden recombinarse formando nuevas cepas de VAEC-VMV [25, 43]. La primer evidencia de esta transmisión cruzada se obtuvo mediante el análisis de secuencias derivadas de borregos infectados en Francia, las cuales mostraron que el virus estaba más relacionado a la AEC, específicamente al grupo B2, que a Maedi-Visna (grupo A) [2, 14, 43, 87, 88, 89]. Además, estudios epidemiológicos han demostrado la transmisión viral a partir de borregos infectados con cepas de Maedi-Visna (grupo A4) a cabras [2, 16, 43].

1.3.2 Patogenia

Los LvPRs infectan monocitos-macrófagos, células epiteliales y células dendríticas (células permisivas) [2, 4, 9, 40, 43, 90, 91]. El virus entra e integra su genoma viral en los monocitos (provirus), de tal forma, que éstos llevan el provirus en su genoma mostrando una baja o nula replicación viral. Estas células latentemente infectadas se diseminan a diferentes órganos, evadiendo la respuesta inmune [2, 43, 90, 92]. La maduración de estos monocitos a macrófagos, favorece la expresión de factores de transcripción, necesarios para la replicación viral y la producción de partículas virales infecciosas [2, 4, 6, 9, 43, 92]. El virus persiste en monocitos y macrófagos infectados permitiendo un estado de latencia

por periodos variables (entre seis y doce meses, aproximadamente), de esta forma, si un animal es infectado con LvPR permanecerá infectado toda su vida [6, 7, 9, 17, 36, 43, 92].

El período de incubación es altamente variable. La mayoría de los animales se infectan en edad temprana y desarrollan la enfermedad meses o años más tarde [5, 7]. Los primeros hallazgos histopatológicos en los órganos blanco, se pueden presentar en el primer o segundo año post-infección, sin embargo, a pesar de iniciar las lesiones en los órganos, el animal puede permanecer infectado de forma subclínica por largos periodos; incluso animales permanecen sin signos toda su vida y sólo un 25-30% de los animales seropositivos desarrollan algún cuadro clínico; no obstante, estos animales pueden eliminar el virus y ser una fuente de infección para otros animales no infectados [2, 5, 6, 7, 9, 11, 17, 36].

Las manifestaciones clínicas y subclínicas de LvPR, se asocian a lesiones inflamatorias progresivas por células mononucleares en pulmones, articulaciones, ubres y sistema nervioso central. La característica principal en ovejas infectadas es debilitamiento y dificultad para respirar asociado a un cuadro de neumonía; mientras que en cabras se presenta encefalitis, artritis y mastitis indurativa, las cuales afectan considerablemente la producción [17, 28, 43].

La encefalitis generalmente ocurre en animales jóvenes de dos a seis meses de edad, aunque también se ha reportado en individuos con un mes de edad; no obstante, rara vez se presenta en animales adultos [2, 5, 7, 28]. Sus principales signos incluyen debilidad de los miembros, con hipertonía, hipersensibilidad y ataxia, estos signos neurológicos empeoran gradualmente a paresia, tetraparesia y a parálisis total. Algunos animales afectados pueden mostrar opistótonos, movimientos circulares, ceguera, nistagmo, alteración del nervio facial y disfagia [5, 7, 28]. Histológicamente, la encefalitis muestra lesiones

inflamatorias en medula espinal, cerebro, meninges y plexo coroideo, donde se observa infiltrado leucocitario perivascular, proliferación de células de la glia, así como desmielinización acompañada de malacia y calcificación focal de la materia gris [2, 3, 28].

Por el contrario, la artritis comúnmente se observa en animales adultos y se caracteriza por una inflamación de la articulación carpal con distensión de la cápsula articular, sinovitis, bursitis y un grado variable de cojera [2, 3, 7, 25, 28]. Microscópicamente se observa hiperplasia de células sinoviales con marcado engrandecimiento del vello sinovial, infiltrado mononuclear perivascular con presencia de células plasmáticas, necrosis periarticular y capsular, así como zonas de mineralización con infiltrado linfocítico; en casos graves se ha presentado destrucción del cartílago con ruptura de ligamentos y tendones [3, 7, 25, 28].

El cuadro de mastitis indurativa es caracterizado por un infiltrado mononuclear en el tejido interlobulillar y en algunos casos puede presentarse agalactia [5, 7, 11, 28]. No obstante, el impacto que ocasiona la mastitis en la producción es controversial; en algunos estudios no se han detectado diferencias en la cantidad y calidad de la leche en cabras infectadas y no infectadas [43, 93, 94]. Otros trabajos han mostrado una reducción en la producción de leche en cabras hasta en un 9%, sin alterar la calidad de la misma [43, 95]. Finalmente, existen reportes que indican una reducción en la producción de leche en un 15% asociada a una baja calidad (disminución en el contenido de grasa) de la misma [43, 96, 97]. En ovinos se ha observado un reducción en la producción y cantidad de grasa en leche en 2% y 3.2%, respectivamente [43].

Los LvPR inducen una respuesta serológica, sin embargo, existe poca afinidad a anticuerpos neutralizantes y por tanto bajos títulos de los mismos, de manera que la infección no puede ser controlada únicamente por anticuerpos. La inmunoglobulina

subtipo G1 (IgG1) ha sido identificada como el anticuerpo dominante durante la respuesta humoral contra las proteínas de *gag* y *env*. En la respuesta celular, los linfocitos T citotóxicos (CTLs) juegan un papel importante como células efectoras, inhibiendo la replicación viral. No obstante, la producción de citocinas sobre los grupos celulares favorece la presencia de lesiones en tejidos. Asimismo, en respuesta a la presencia del retrovirus, la célula produce proteínas intracelulares conocidas como factores de restricción, éstas bloquean el ciclo viral en diferentes puntos, usando diversas estrategias. Una de estas proteínas es TRIM5 (Motivo Tripartido de la Proteína 5 alfa), la cual inhibe la síntesis de ADN viral, al inducir el desnudamiento prematuro del virus [25].

1.3.3 Diagnóstico

Existen diversas técnicas diagnósticas para evaluar la presencia de LvPR en ovinos y caprinos, las cuales están basadas en la detección directa e indirecta del virus [11, 98].

El diagnóstico basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es el método molecular más usado en la identificación de LvPR; no obstante, los métodos indirectos (técnicas serológicas) son los más frecuentemente usados para detectar la infección contra estos lentivirus debido a su accesibilidad [43].

Las pruebas serológicas incluyen la inmunodifusión en gel agar (IDGA), inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunoelectrotransferencia o Western Blot (WB) y radioinmunoprecipitación (RIPA) [6, 11, 43, 98].

La IDGA ha sido un método clásico para la detección de anticuerpos contra LvPR en animales domésticos [6, 11, 17, 99]. Se considera que esta prueba es altamente específica (98-100%) pero relativamente poco sensible (75-76%) [6, 11, 17, 98, 99, 100].

La prueba de ELISA es usada para trabajar un gran número de muestras y es más sensible (84-98%) que la IDGA [6, 11, 98, 99, 101]. Los ELISAs comúnmente usados para la detección de anticuerpos contra LvPR son los indirectos (I-ELISA) y competitivos (C-ELISA) usando anticuerpos monoclonales [17, 99, 100]. Para este método se pueden usar un gran número de antígenos, tales como virus completos, recombinantes y péptidos sintéticos que contengan epítomos inmunodominantes [11, 17, 100, 102, 103]. No obstante, debido a la heterogenicidad en las cepas virales, es necesario seleccionar el antígeno adecuado, que contenga epítomos presentes de la cepa viral circulante en la región en estudio [11, 43].

De esta forma, la sensibilidad y especificidad de la IDGA y del ELISA, dependerá de la cepa viral usada en la prueba, de la preparación del antígeno vírico y de la prueba estándar de comparación [6, 11, 17]. Los análisis de inmunotransferencia tipo Western blot y/o la radioinmunoprecipitación, son los estándares de comparación frecuentemente usados para establecer la sensibilidad y especificidad de estas pruebas serológicas [6, 11, 17, 98, 99].

La inmunoelectrotransferencia, es el método serológico que permite la detección de anticuerpos dirigidos contra las diferentes proteínas del virus, las cuales son separadas según su peso molecular [18, 98, 99, 104]. Esta técnica muestra alta sensibilidad (92-100%) y especificidad (98-100%) y se usa de manera rutinaria como prueba confirmatoria en la mayoría de los laboratorios [6, 11, 18, 99, 104].

En el diagnóstico serológico la principal limitante consiste en el tiempo de seroconversión de los animales, lo cual puede ocurrir semanas, meses o años post-infección [11, 17, 43, 105]. Algunos animales pueden permanecer seronegativos o bien, presentar bajos títulos y llegar a ser transitoriamente seronegativos, afectando el resultado de estas pruebas diagnósticas [5, 7, 11, 17, 43, 105].

Debido a que la seroconversión, tarda largos periodos e incluso algunos individuos no desarrollan una respuesta de anticuerpos detectable con las pruebas serológicas antes mencionadas. Las técnicas para la detección de ácido nucléico viral, pueden ser útiles en la identificación de algunos casos donde los animales aún no han seroconvertido [6, 43, 65, 99, 106].

Las propiedades biológicas y genéticas del virus, el tejido muestreado y la carga viral en el momento en que se toma la muestra, son aspectos que se deben considerar en la detección de ácido nucléico viral. Para la identificación de LvPR, la muestra comúnmente usada es sangre periférica; sin embargo, la carga viral puede fluctuar en el tiempo y puede ser diferente entre individuos [11, 43, 107].

Las pruebas para detectar el virus comprenden el aislamiento viral a través de cultivo celular y la detección de fragmentos del genoma viral mediante PCR o transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y tiempo real (qPCR) [6, 43, 98, 99].

La PCR es el método clásico para demostrar la presencia del virus [11]. Los primeros protocolos estandarizados para LvPR fueron diseñados en los años 90 [2, 43].

Esta técnica es considerada una herramienta exitosa en el diagnóstico de LvPR, debido a su habilidad para detectar los ácidos nucléicos del virus en las células infectadas con el provirus (ADN viral) o en exudados que contengan partículas virales libres (a través de una RT-PCR) [43]. Además de la PCR convencional, existen variantes de esta técnica, como la PCR anidada o semi-anidada, cuyo objeto es aumentar la sensibilidad en esta prueba [43, 98, 99, 108].

Diversos estudios han demostrado la utilidad de la PCR en la detección de LvPR, a partir de diferentes muestras de animales infectados, entre las cuales se encuentran las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), leche o secreciones de glándula mamaria, líquido sinovial, semen y otros tejidos [43, 74, 77, 79, 84, 85, 87, 99, 101, 105, 108].

La eficiencia de esta técnica depende de la especificidad en el diseño de los iniciadores y la región que se amplificará [11, 98, 99]. La baja carga viral existente en los animales infectados, la baja proporción de células permisivas en algunos tejidos (1 monocito infectado en 10^4 - 10^5 PBMC) y la alta tasa de variabilidad genética puede dificultar el diagnóstico de LvPR mediante este método [11, 43, 107, 109].

Una ventaja de la PCR sobre las pruebas serológicas, consiste en la detección de la infección en animales jóvenes con anticuerpos calostrales o en aquellos individuos que no presentan seroconversión [11, 43, 105]. Asimismo, los productos de PCR pueden ser secuenciados sistemáticamente, lo que permite mejorar el diseño de los iniciadores para la realización de nuevas PCRs, aumentando el rango de reconocimiento [3, 11, 49, 101].

El aislamiento viral es una prueba que requiere células mantenidas en medios de cultivo específicos, las células se inoculan con una muestra sospechosa o previamente identificada por PCR y se incuba a 37 °C hasta observar un efecto citopático. El aislamiento viral es una técnica laboriosa que puede complicarse debido a la ausencia de líneas celulares permisivas y/o por una limitada producción viral en los cultivos celulares [43, 110].

Debido a que los LvPR muestran una alta producción viral en células permisivas como los macrófagos, estas células son comúnmente usadas para el aislamiento del virus. Las células de membrana sinovial (fibro-epiteliales) y las células de plexo coroideo derivadas

de cabras y ovinos, también se utilizan rutinariamente para el aislamiento *in vitro* de LvPR. Otro tipo celular permisivo a la infección de LvPR son explantes de pulmón, fibroblastos de piel, bazo y células de córnea, células de testículo, células epiteliales de glándula mamaria (TIGMEC-línea celular), células de la granulosa y oviducto, células de la microglia, hepatocitos, entre otras. Sin embargo, la restricción en la expresión del virus y el bajo número de células infectadas encontradas en estos tejidos, debe tomarse en consideración para determinar la relevancia biológica al realizar el aislamiento de LvPR en estas células [43, 74, 77, 79, 90, 110].

Los LvPRs son altamente variables genética y antigénicamente; asimismo muestran diferencias fenotípicas *in vitro*. Específicamente, los aislados pueden diferir de otros por su capacidad de selección y producción de partículas virales infecciosas en ciertos tipos celulares e incluso en su capacidad de inducir un determinado efecto citopático. Frecuentemente, los aislados ovinos se replican rápidamente e inducen la formación de sincitios, lisis celular y altos títulos virales. En contraste, aquellos aislados provenientes de caprinos, se caracterizan por una replicación lenta y bajos títulos virales. Finalmente, los LvPR que presentan una velocidad de replicación intermedia han sido aislados de ambas especies [43].

El aislamiento de LvPR se puede realizar a partir de animales vivos, o bien con muestras de tejidos obtenidas de necropsias [5, 7, 17]. En animales vivos infectados, las muestras para obtener preparaciones de leucocitos o partículas virales son sangre periférica, leche y líquido sinovial aspirado de las articulaciones [17].

Los LvPR pueden ser aislados a partir de monocitos-macrófagos circulantes en sangre (PBMC), los cuales son co-cultivados en células de membrana sinovial (CMS), células de plexo coroideo o incluso en fibroblastos de piel, para evidenciar el efecto citopático,

caracterizado por la formación de sincitios [5, 6, 7, 11, 43]. La presencia del virus también se puede confirmar con otros métodos como la microscopia electrónica e inmunomarcaje [5, 6, 7, 11, 98].

Los métodos inmunohistoquímicos permiten la detección del virus a través de anticuerpos específicos utilizando tejidos histológicos, frotis, entre otros. Esta prueba es de gran utilidad como prueba confirmatoria, sin embargo, es un método poco utilizado en el diagnóstico de LvPR, debido al costo y a la poca disponibilidad de reactivos [43, 110].

La distribución geográfica de las diferentes cepas de LvPR, puede influenciar los resultados de las pruebas serológicas y moleculares, sobre todo en aquellas cepas que se transmiten interespecie [43]. Las técnicas moleculares de PCR, clonación y secuenciación, permiten conocer las cepas específicas de un país o región, brindando información acerca del tipo de prueba serológica y antígeno que se debe usar [17].

Algunos reportes mencionan que la combinación de ELISA con PCR (ADN proviral), ha demostrado ser la mejor estrategia para el diagnóstico de LvPR, sin embargo, es necesario conocer las variaciones antigénicas y genéticas de las cepas circulantes para optimizar la sensibilidad de estos ensayos [49, 99, 110].

1.3.4 Prevención y control

Actualmente, no existe tratamiento ni vacuna eficaz contra LvPR, por lo que su erradicación dependerá de programas de prevención y control, basados principalmente en la identificación de animales infectados mediante el uso de pruebas serológicas y/o moleculares para su posterior eliminación o aislamiento [25, 36, 111].

Con la finalidad de desarrollar programas de control y erradicación efectivos, es necesario que las pruebas diagnósticas usadas para identificar animales infectados, sean sensibles a las cepas locales de LvPR que están circulando en una región determinada [25, 49]. Como consecuencia, la detección de animales infectados mediante pruebas serológicas confiables, resulta primordial para mantener los hatos libres de esta enfermedad [18, 110, 111].

Se ha demostrado que la exportación de razas de ovinos y caprinos, ha resultado en la diseminación constante de los LvPRs en diferentes partes del mundo [11, 29, 75, 111]. En contraste, razas nativas, que no han tenido contacto con las razas importadas, son libres de este virus [11, 27, 29]. Bajo este panorama, si el desarrollo de la caprinocultura demanda tecnificación y mejora genética en los rebaños, estas medidas deben ser acompañadas de campañas permanentes de vigilancia sanitaria para controlar y erradicar las enfermedades que la afectan [29, 35].

Debido a la amplia distribución mundial de LvPR, diversos trabajos sugieren que los animales de importación y aquellos que están sujetos a movilizaciones nacionales, estén libres LvPR; evitando así, la difusión de dicha enfermedad en nuestro país [27, 29].

En muchos países, el método más usado para prevenir la infección por LvPRs consiste en realizar pruebas periódicas con las técnicas de ELISA y/o IDGA, adquirir animales únicamente de rebaños libres de esta enfermedad; separar a las crías de madres seropositivas, inmediatamente después del nacimiento y alimentarlos con calostro pasteurizado, o bien, previamente calentado a 56°C durante 60 minutos o hasta 63°C por 15-20 segundos (termización) para prevenir la infección [2, 5, 6, 7, 99, 110, 111].

En Suiza, la erradicación de LvPR inicio voluntariamente en 1984, cuando la seroprevalencia alcanzó un 60-80% aproximadamente en los animales. Diversas

instancias federales y autoridades regionales, iniciaron proyectos de investigación para realizar estudios epidemiológicos y estandarizar métodos diagnósticos. A partir de 1998, su seroprevalencia disminuyó hasta el 1% [11, 110]. De igual manera ha sucedido en Noruega, donde los programas de control han reducido la seroprevalencia hasta el 1% [5, 7, 11, 110].

La eliminación de animales seropositivos, así como la separación de animales seronegativos de los serológicamente positivos y el estricto control en la movilización de animales, son otras medidas adoptadas en programas introducidos en Francia, Italia, Alemania, España, Finlandia y Suiza [11, 110].

Debido a los casos documentados de transmisión interespecie en forma natural y experimental; como el descrito en Suiza, donde el virus de AEC fue reintroducido en hatos caprinos libres, por la convivencia con ovinos. Estos resultados sugieren que los programas de control y erradicación de LvPR, no solo deben estar encaminados para AEC en caprinos, sino también para Maedi-Visna en ovinos y viceversa [7, 11].

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la ausencia de pruebas serológicas elaboradas en el país que permitan un monitoreo constante del LvPR; es necesario evaluar alternativas de diagnóstico locales, por lo que la obtención de una proteína recombinante para ser utilizada como antígeno y derivada de virus que se encuentran infectando caprinos en el país, puede favorecer el desarrollo de técnicas diagnósticas más sensibles que permitan la identificación y control de LvPR que infectan rebaños nacionales.

3. HIPÓTESIS

El sistema de *Escherichia coli* será capaz de permitir la expresión de la proteína p25 (cápside) de LvPR, conservando sus propiedades inmunogénicas al ser reconocida por anticuerpos obtenidos de animales infectados naturalmente con LvPR.

4. OBJETIVO GENERAL

Obtener la expresión de la proteína recombinante p25 de LvPR de origen caprino, empleando el sistema de *Escherichia coli* para demostrar su inmunoreactividad utilizando sueros obtenidos de cabras infectadas con LvPR.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar caprinos infectados por LvPR.
2. Estandarizar una RT-PCR que amplifique la región de *gag-p25* (cápside) a partir de ARN viral.
3. Clonar, expresar y purificar la proteína recombinante p25 de LvPR en *E. coli*.
4. Identificar la inmunoreactividad de la proteína recombinante p25 de LvPR mediante la técnica de Western blot.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

A partir del suero y líquido sinovial de un caprino con signos clínicos de artritis de la región centro del país, se realizó el diagnóstico serológico y molecular para determinar la infección por LvPR.

El suero se analizó a través del método de ELISA competitivo, usando un kit comercial para ovinos y caprinos (ELISAc de VMRD)^a; para el líquido sinovial se realizaron dos PCRs, la primera utilizando un par de iniciadores reportados por *Daltabuit et al*, 1999., que amplifican un fragmento de 249 pares de bases (pb) del gen *gag* de LvPR ^[36]. La segunda, usando otro par de iniciadores, los cuales amplifican un producto de 233 pb de la región LTR de LvPR.

Las muestras de suero y líquido sinovial fueron positivas a LvPR tanto en el ELISAc, como en ambas PCRs. El líquido sinovial fue utilizado para la obtención del producto correspondiente a la región de *gag-p25* (cápside).

6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.1.1 Diseño de iniciadores para la amplificación de la región *gag-p25* (cápside)

Se sintetizó un par de iniciadores, usando el software Clustal 2.1^b para el alineamiento de las secuencias y el programa Serial Cloner Software 2.6 para el ensayo *in silico* de los mismos. Los iniciadores se diseñaron basándose en la secuencia homóloga del gen *gag*

^a VMRD, Inc, Washington, EUA

^b <http://www.clustal.org/>

de lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) disponibles en el GenBank, para amplificar un fragmento de 667 pb, correspondiente a la proteína de cápside (p25):

Gag-p25-1 5' – AGTGTCTTCCCAATAGTAGTGC – 3'

Gag-p25-2 5' – CTGATCCCACATCTCTACATGC – 3'

La homología de los iniciadores, fue comprobada por medio de la base de datos BLAST (Basic local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center of Biotechnology Information)^c (Figuras 3 y 4).

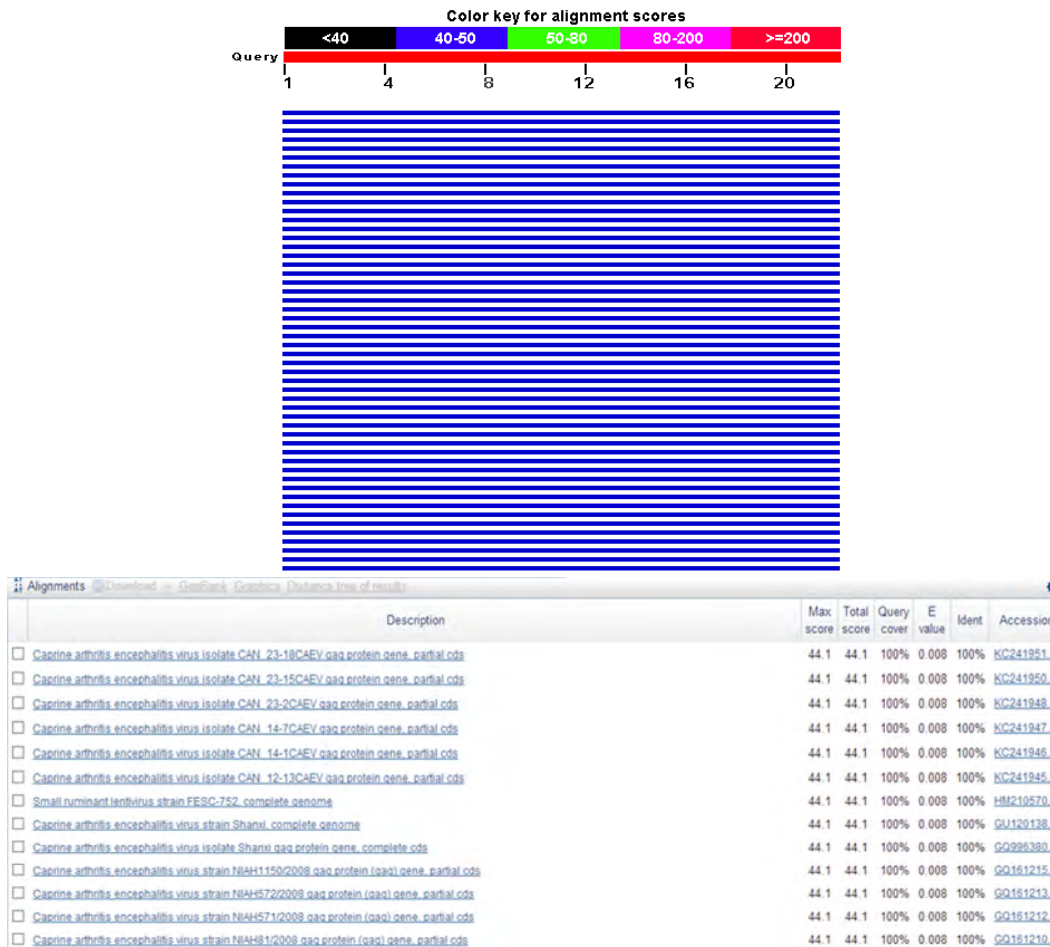


Figura 3. Diagrama donde se muestra la similitud de las secuencias reportadas en el GenBank con la secuencia del iniciador Gag-p25-1, mediante BLAST del NCBI.

^c <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

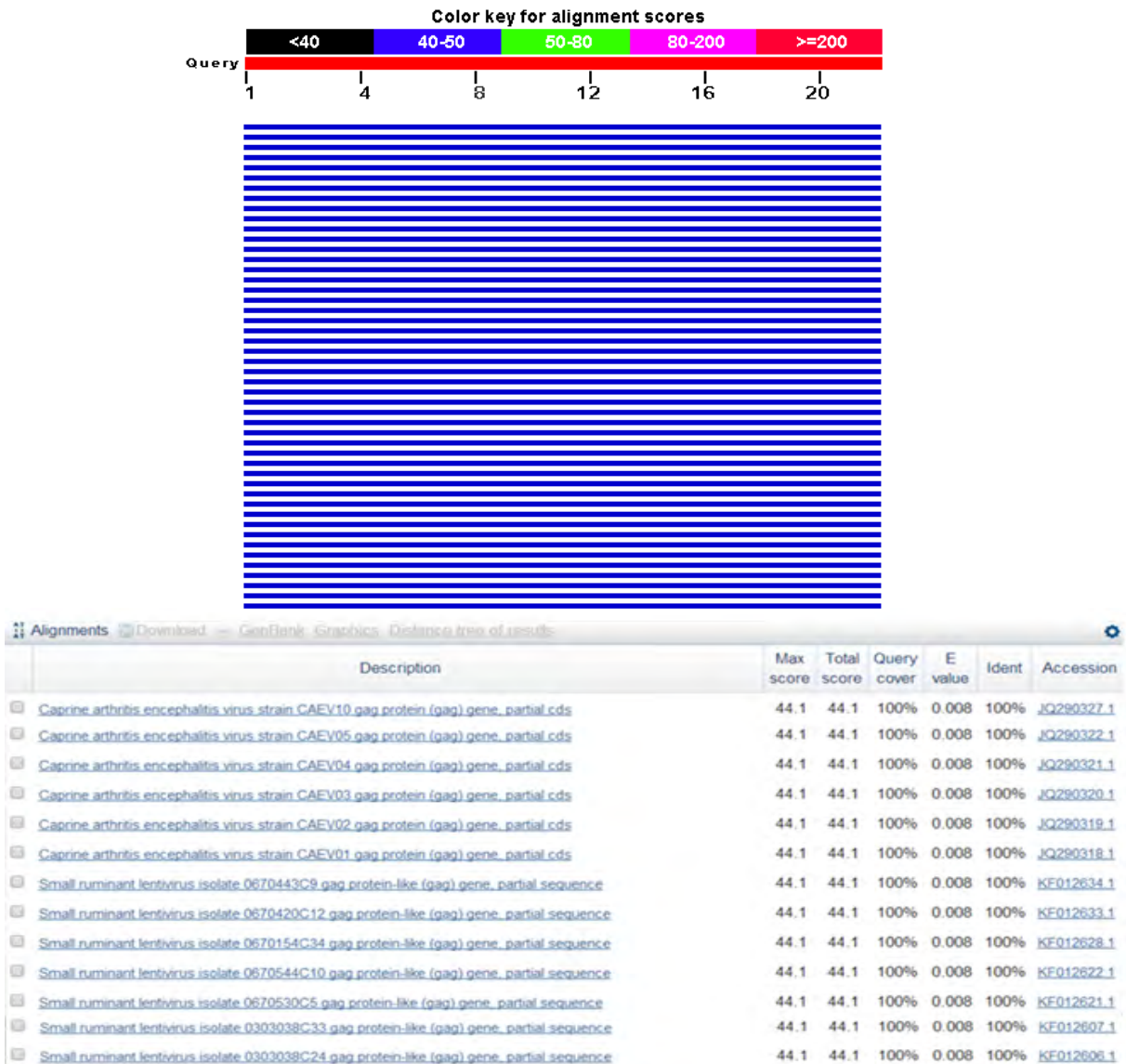


Figura 4. Diagrama donde se muestra la similitud de las secuencias reportadas en el GenBank con la secuencia del iniciador Gag-p25-2, mediante BLAST del NCBI.

6.1.2 Extracción de ARN a partir de líquido sinovial

La extracción de ARN viral se realizó a partir de líquido sinovial de una cabra con signos clínicos de artritis y positiva a las técnicas de ELISAc y PCR, utilizando el método de extracción de ARN con Trizol®^d, siguiendo las recomendaciones del fabricante y realizando algunas modificaciones.

Se colocaron 400 µL de líquido sinovial en un microtubo y se agregó 1 mL de Trizol®. Se incubó durante 5 minutos (min) a 4°C. Posteriormente, se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente la mezcla por 15 segundos y se incubó por 2 min a 4°C.

Pasada la incubación, se centrifugó en una microcentrífuga refrigerada^e a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo. Se precipitó el ARN con 0.5 mL de isopropanol frío, se mezcló suavemente por inversión y se incubó 10 min a 4°C.

Se volvió a centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C y se retiró el sobrenadante para obtener la pastilla de ARN.

La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 75% preparado con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC)^f al 0.1%. Se centrifugó a 7, 500 rpm durante 6 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla de ARN se suspendió en 30 µL de agua con DEPC al 0.1%.

^d Invitrogen®, California, EUA

^e Labnet International, Inc, New Jersey, EUA

^f Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA

Después de la extracción, se determinó la concentración de ARN total de la muestra, mediante espectrofotometría (NanoDrop ND 1000)^g. Finalmente, la muestra de ARN se almacenó en un ultracongelador a -70°C hasta su uso.

6.1.3 Síntesis de ADNc (ADN complementario) a partir del ARN total

La síntesis de ADNc se llevó a cabo en dos pasos, empleando el kit comercial First Strand cDNA Synthesis Kit^g, siguiendo las indicaciones del fabricante y realizando algunas modificaciones.

La amplificación del ADNc se realizó en un volumen de reacción de 20 µL. En la primer fase, se colocaron en un tubo estéril de 0.2 mL para PCR, 1 µg de ARN total, 1.6 µL de oligo (dT) y agua estéril libre de nucleasas cuanto baste para (c.b.p) 10 µL. Esta mezcla se incubó 5 min a 65°C. Posteriormente, para la segunda fase, al microtubo se le adicionó 4 µL del buffer de reacción 5X, 1 µL del inhibidor de RNAsas (20 U/ µL), 2 µL de mezcla de nucleótidos trifosfatados (dNTP's) a una concentración de 10 mM, 1 µL de Transcriptasa reversa (20 U/ µL) y agua estéril libre de nucleasas c.b.p 10 µL. La mezcla se incubó a 37°C por 90 min, posteriormente a 95°C durante 10 min y finalmente a 30°C por 30 segundos.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo en un termociclador^h y el ensayo contó con un control negativo (tubo sin ARN). El ADNc fue almacenado a -20°C hasta su uso.

^g Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA

^h Labnet International, Inc. New Jersey, EUA

6.1.4 PCR para la amplificación de la región gag-p25-cápside

Se estandarizó una PCR para amplificar una región del gen *gag*, correspondiente a la proteína p25-cápside de LvPR de 667 pb.

La amplificación se realizó en un volumen final de 13 μ L, se agregó 1 μ L de cada uno de los iniciadores Gag-p25-1 y Gag-p25-2 a una concentración de 10 picomoles (pmol) / μ L, 6.5 μ L de PCR Master Mixⁱ y 1 μ L de ADNc a una concentración de 150 nanogramos (ng). La PCR se realizó en un termociclador con las temperaturas que se mencionan a continuación: un ciclo de 95°C por 3 min (desnaturalización inicial), 40 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturalización), 58°C por 30 segundos (alineamiento), 72°C por 1 min (extensión) y un último ciclo de 72°C por 7 min (extensión final) (Figura 5).

La visualización del producto amplificado por PCR se realizó separando el producto de amplificación mediante geles de agarosa al 2.5% en amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE), por electroforesis en una cámara horizontal^l, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados en un fotodocumentador^k.

ⁱ Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA

^j Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

^k Kodak, New York, EUA

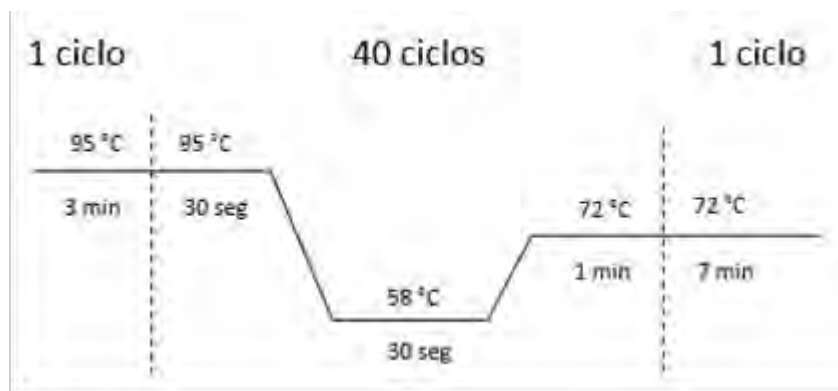


Figura 5. Esquema de los ciclos de tiempos y temperaturas de la PCR para amplificar la región del gen *gag* correspondiente a la proteína p25-cápside.

6.1.5 Purificación y secuenciación del producto de PCR *gag*-p25-cápside

Previo a la secuenciación de los productos de PCR que amplificaron el fragmento correspondiente a la proteína p25 de LvPR, se realizó la purificación de dichos productos mediante una columna comercial QIAquick Gel Extraction Kit^l, siguiendo las recomendaciones del fabricante, el ADN fue suspendido en 30 µl de solución EB precalentada (proporcionada por el fabricante) y se almacenó a -20°C.

El purificado fue enviado por duplicado a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología perteneciente a la UNAM, campus Morelos, para obtener la secuencia de dicho producto.

6.2 Clonación de la proteína p25

La secuencia nucleotídica de la proteína p25 fue ligada al vector comercial ChampionTM pET-SUMO Protein Expression System^m (Figura 6), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente esta construcción se introdujo en células competentes de

^l Qiagen®, California, EUA

^m Invitrogen®, California, EUA

Para la transformación de células competentes, primero se descongeló un vial de células (*E.coli* Mach1™-T1^R) colocándolo en hielo. Una vez descongelado se adicionaron 2 µL de la reacción de clonación, se mezcló suavemente sin usar la pipeta e inmediatamente se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se realizó el choque térmico a 42°C durante 30 segundos y rápidamente se volvió a colocar en hielo por 2 min; a este tubo se agregaron 250 µL de medio S.O.C (proporcionado por el fabricante) y se incubó a 37°C con agitación por 1 hora. Finalmente, se tomaron 100 µL de ese tubo y se sembraron en placas con medio Luria-Bertani (LB) sólido, adicionado con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37 °C toda la noche.

6.2.1 Extracción del plásmido mediante lisis alcalina para la expresión de p25-cápside

Se eligieron al azar las colonias transformadas en el agar LB con kanamicina y a éstas se les realizó la extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina usando el protocolo para volúmenes medios, descrito por Sambrook ^[112].

Brevemente, cada una de las colonias crecidas se transfirió a un matraz con 50 mL de medio LB líquido adicionado con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C con agitación toda la noche. Pasado este tiempo, el medio se colocó en tubos de fondo cónico de 15 mL, se centrifugaron a 6,000 rpm durante 15 min. Se decantó el sobrenadante, se suspendieron las pastillas en 200 µL de solución de lisis I fría (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM y EDTA 10 mM), se transfirieron a un microtubo y se homogenizaron con ayuda de un vórtex y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Pasada la incubación, se

adicionaron 400 μ L de solución de lisis II preparada al momento (NaOH 0.2 N, SDS 1 %), se mezclaron por inversión y se incubaron a 4°C durante 10 min.

Posteriormente, se agregaron 300 μ L de la solución de lisis III fría (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial), se mezclaron por inversión y se incubaron durante 5 min a 4°C; se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo, se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo (25:25) y se mezcló con vórtex hasta homogenizar, se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo y se precipitó el ADN plasmídico con 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubaron a 4°C por 5 min; se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante por decantación y se lavaron las pastillas con 1 mL de etanol frío al 70%, se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 2 min; se eliminó el sobrenadante por decantación y se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente.

Finalmente, las pastillas se suspendieron en 300 μ L de solución TE (tris (hidroximetil) aminometano-ácido etilendiaminotetraacético 10:1 mM pH 8). Las muestras de ADN plasmídico se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.2.2 Selección de plásmidos

Con la finalidad de corroborar la presencia del inserto en las colonias transformadas, se realizó una PCR con los iniciadores de Gag-p25-1 y Gag-p25-2, así como con los iniciadores pET-Fw y pET-Rv (proporcionados por el fabricante)^o. Cada colonia transformada fue sometida a 2 reacciones de PCR, una para la región genética de la proteína p25-cápside y la otra para los controles pET. Asimismo, se incluyó un control de

^o Invitrogen®, California, EUA

reacción (Control Reaction Cloning), el cual amplifica un fragmento de 750 pb (proporcionado por el fabricante).

6.2.3 Purificación y secuenciación del ADN plasmídico

Previo a la expresión de aquellos plásmidos con la secuencia nucleotídica de la proteína p25, se realizó su purificación y secuenciación. La purificación se llevó a cabo mediante una columna comercial QIAprep Spin Miniprep Kit^p, siguiendo las recomendaciones del fabricante, el ADN fue suspendido en 70 µL de solución EB precalentada (proporcionada por el fabricante) y se almacenó a -20°C.

El purificado se envió por duplicado a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM, campus Morelos.

6.3 Expresión de la proteína p25

Una vez verificada la secuencia del ADN plasmídico, se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante p25-cápside, siguiendo las indicaciones del fabricante y usando células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (One Shot® BL21 (DE3) Chemically Competent *E.coli*)^q.

Para la expresión, primero se descongeló un vial de células BL21 (DE3) colocándolo en hielo. Una vez descongelado se adicionaron 10 ng del ADN plasmídico que contenía el inserto de la región genética de la proteína p25, se mezcló suavemente sin usar la pipeta

^p Qiagen®, California, EUA

^q Invitrogen®, California, EUA

y se incubó por 30 min en hielo. Pasada la incubación, se realizó un choque térmico a 42°C durante 30 segundos y se transfirió nuevamente en hielo por 2 min. Se adicionaron al tubo 250 µL de medio S.O.C (proporcionado por el fabricante) y se incubó a 37°C con agitación durante 1 hora. Posteriormente, se tomó toda la mezcla de la transformación y se sembró en 10 mL de medio LB líquido adicionado con kanamicina (50 µg/mL) y glucosa al 1%. Finalmente, se incubó a 37°C con agitación toda la noche.

Del cultivo resultante, se tomaron 500 µL y se inocularon en 10 mL de medio LB líquido adicionado con kanamicina (50 µg/mL) y glucosa al 1%, éste cultivo se incubó a 37°C con agitación, durante dos horas para alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.4-0.6 (etapa logarítmica).

6.3.1 Curva de crecimiento

Una vez alcanzada dicha densidad en el cultivo se tomó una alícuota de 500 µL, la cual se determinó como 'fase cero' en la curva de expresión. Posteriormente, el cultivo se dividió en dos cultivos de 5 mL; a uno, se le adicionó IPTG (isopropil β-tiogalactopiranosido)^r a una concentración final de 1mM, obteniendo un cultivo inducido; el otro cultivo de 5mL, se procesó sin inducir (sin IPTG). Finalmente, los dos cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante 5 horas, tomando una alícuota de 500 µL en fases de tiempo de 30 minutos para cada uno de los dos cultivos.

^r Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA

6.3.2 Lisis protéica

Para obtener el extracto crudo de las colonias bacterianas las alícuotas de cada fase de tiempo, se centrifugaron a 13, 000 rpm por 2 min; la pastilla bacteriana se suspendió en 300 µL de buffer de lisis (Tritón 100X al 0.5%, glicerol al 10%, KCl 100mM, NaCl 400mM, imidazol 10mM y fosfato de potasio 50 mM pH 7.8), la mezcla se sometió a 5 ciclos de congelación y descongelación y posteriormente a tres ciclos de sonicación (ciclos de 2 min con pulsos de 10 segundos y descansos de 5 segundos) para romper las células. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13, 000 rpm durante 10 min a 4°C para obtener las proteínas solubles totales, contenidas en el sobrenadante, el cual se transfirió a un nuevo tubo. Las proteínas solubles totales se almacenaron a -20°C hasta ser procesadas.

6.3.3 Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteína en cada una de las fases se llevó a cabo mediante el método de Bradford, realizando una curva de referencia con albúmina sérica bovina (ASB) utilizando concentraciones finales de 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 µg/µL. Una vez obtenida la curva, se hizo la cuantificación de cada una de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Como controles se usaron 100 µL del reactivo Bradford^s y 100 µL de agua Mili Q.

^s Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

6.3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron visualizadas mediante geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. El gel separador se preparó en un volumen final de 10 mL (3.35 mL de agua destilada, 4 mL de acrilamida^t al 30%, 2.5 mL de Tris^t 1.5 M pH 8.8, 0.1 mL de SDS^u 10%, 0.08 mL de persulfato de amonio^u al 10% y 0.007 mL de TEMED^u), mientras el gel concentrador, en un volumen final de 5 mL (3 mL de agua destilada, 0.65 mL de acrilamida al 30%, 1.25 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 0.05 mL de SDS al 10%, 0.04 mL de persulfato de amonio al 10% y 0.0035 mL de TEMED).

Previo a la electroforesis, las muestras fueron desnaturalizadas en ebullición (95°C) durante 5 min con el amortiguador de carga para proteínas Laemmli 2X^v, en una relación 1:1 y se colocaron 40 µg de muestra en cada pozo. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara vertical^v a 60 volts para el gel concentrador y a 80 volts para el gel separador.

Una vez establecido el tiempo óptimo de crecimiento de las *E. coli* transformadas, se prepararon 2 geles de poliacrilamida, uno se tiñó con azul de Comassie^u para la visualización de las proteínas y el otro se utilizó para la inmunotransferencia.

6.3.5 Transferencia de proteínas

Posterior a la separación de proteínas por electroforesis, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno)^w mediante un buffer de transferencia (Tris

^t AMRESCO®, Ohio, EUA

^u Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA

^v Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

^w Millipore®, Massachusetts, EUA

25 mM, Glicina^x 192 mM, Metanol^y al 20%). La transferencia de proteínas se realizó en una cámara de inmunotransferencia^z a 350 mA (o 100 volts) durante 90 minutos.

Para corroborar que la transferencia de proteínas se llevó a cabo, se realizó una tinción rápida en la membrana con rojo de Ponceau^{aa} durante 3 min, posteriormente fue destañada con agua destilada.

6.3.6 Inmunodetección

Después de la transferencia, la membrana de PVDF fue bloqueada con ASB al 5% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno, con buffer de lavado (PBS pH 7.2, Tween 20^z al 0.05%) y se incubó toda la noche a 4°C en agitación con una muestra sérica positiva (suero de cabra positiva a LvPR diluido 1:200 en buffer de lavado con leche descremada al 5%), previamente adsorbido con *E. coli* basado en el protocolo de Graber y Zingales ^[113]. Al finalizar la incubación, se realizaron nuevamente tres lavados de 5 min cada uno con buffer de lavado. Se colocó el anticuerpo secundario anti IgG de cabra acoplada a peroxidasa^{aa} (usando una dilución 1:2000) y se incubó durante 2 horas a 37°C en agitación. En seguida, se hicieron tres últimos lavados de 5 min cada uno con buffer de lavado y dos lavados de 5 min cada uno con PBS.

^x AMRESCO®, Ohio, EUA

^y J.T. Baker®, Pennsylvania, EUA

^z Bio-Rad®, Philadelphia, EUA

^{aa} Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA

El revelado de la membrana se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia, utilizando las soluciones Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate^{bb}, siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.3.7 Purificación y secuenciación de la proteína recombinante p25-cápside

La purificación de la proteína recombinante p25 se realizó mediante una columna comercial ProBond™ Purification System^{cc}, siguiendo las recomendaciones del fabricante, la proteína fue suspendida en 4 mL de buffer de elución (proporcionado por el fabricante) y se almacenó a -20°C. Para corroborar que la secuencia correspondía a la región gag-p25, el purificado fue enviado a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM, campus Morelos.

^{bb} Millipore®, Massachusetts, EUA

^{cc} Invitrogen®, California, EUA

7. RESULTADOS

7.1 PCR

7.1.1 RT-PCR para la amplificación de la región genética de la proteína p25-cápside

Se estandarizó la RT-PCR para obtener una amplificación de 667 pb, correspondiente a la región genética de la proteína p25-cápside de LvPR, a partir de ARN viral obtenido de líquido sinovial y utilizando para la PCR los iniciadores Gag-p25-1 y Gag-p25-2. Posteriormente, el producto amplificado fue purificado y usado como inserto (Figura 7).

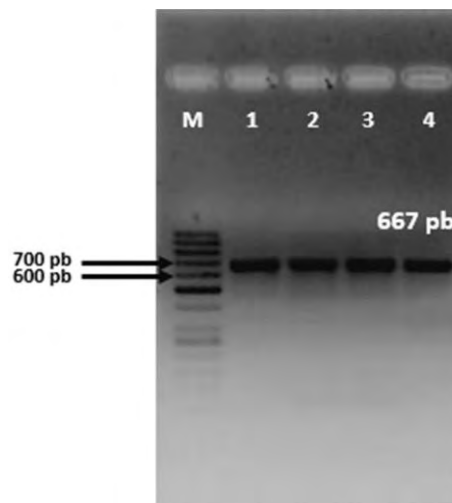
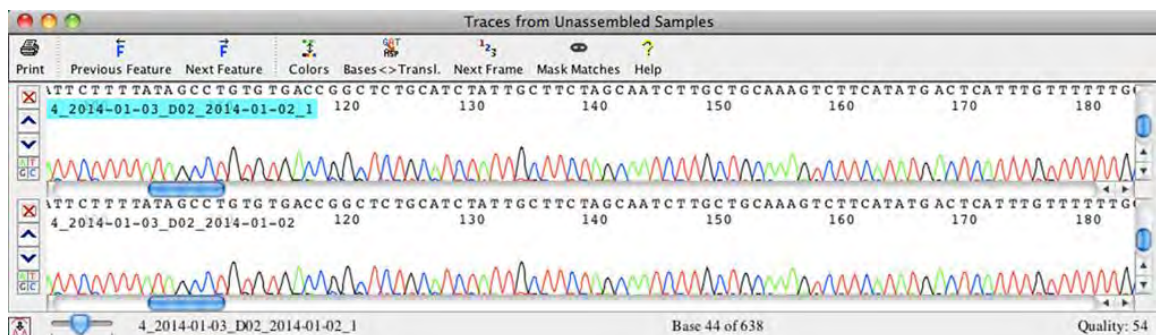


Figura 7. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio donde se observa el producto de amplificación purificado de la región genética de la proteína p25-cápside de LvPR. Carril 1 al 4: Producto de amplificación de 667 pb (proteína p25) después de la purificación; M= Marcador de pares de bases 50 pb GeneRuler^{dd}.

^{dd} Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA

El producto purificado de 667 pb obtenido a partir de la RT-PCR, fue secuenciado y con el electroferograma se construyó la secuencia consenso (Figura 8). La secuencia obtenida fue analizada con BLAST del NCBI. El análisis mostró un porcentaje de identidad del 92-93% con el gen *gag* de LvPR, el cuál codifica para la proteína de la cápside-p25 de LvPR (Figura 9).



TTTGCTTTTGACAATCTGTTGATGCATTTGTATAAGACAATGTCAACTTTAGATATTCTTTTATAGCC
 TGTGTGACCGGCTCTGCATCTATTGCTTCTAGCAATCTTGCTGCAAAGTCTTCATATGACTCATTTGT
 TTTTGTCTTTACTAACATTGGATTCCCTGGTTTGTGAGCCATATGCCTTACTGCTCTTAAGGCTGATA
 TTACCATTGCAGGCATAGTTGTCTTGCCGCATCCATATTGGCTTGCGCTGCTGCTTGATTTGTTTGT
 CCTACCCCATAAATTTGATCCACTGTTAATGCTCCTCCCGCTGGAGGGGGTGGATTATTCCTCCTCCA
 CCTTCTGCTTCCTCATTTAATTTCCCTTGAATTAATTCTTTTGGAGCTCTATTCAGGCATCATGG
 CCAATACTTCTAATATATCTTTACTTGTCCAGGTAGTAGCATAATATGCCAACTG

Figura 8. Electroferograma que muestra la secuencia nucleotídica del producto de PCR.

Descripción	% Identidad	Nº Acceso
Caprine arthritis encephalitis virus isolate CAN 23-15CAEV, <i>gag</i> protein gene, partial cds	93	KC241950.1
Caprine arthritis encephalitis virus isolate CAN 23-2CAEV, <i>gag</i> protein gene, partial cds	93	KC241948.1
Small ruminant lentivirus strain FESC-752, complete genome	93	HM210570.1
Caprine arthritis encephalitis virus isolate BR/UFMG/PL2 capsid protein p25 (<i>gag</i>) gene, partial cds	92	AY101347.1

Figura 9. Cuadro que muestra la similitud de secuencias disponibles en el GenBank (pertenecientes al subtipo B1, circulante en México) con el producto secuenciado.

7.1.2 Clonación de la proteína p25

Una vez obtenido el producto de 667 pb correspondiente al marco de lectura abierto que codifica para la proteína p25-cápside, éste se insertó en el sitio de clonación del vector Champion™ pET-SUMO y posteriormente, se realizó la transformación de las células *E.coli*, de las cuales se obtuvo el ADN plasmídico (Figura 10).

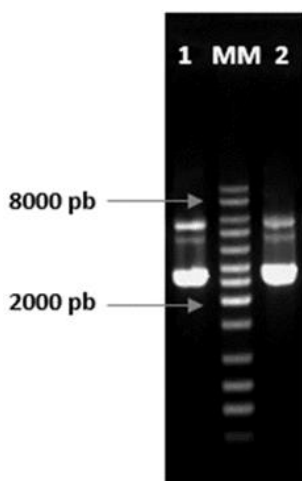


Figura 10. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa el ADN plasmídico de células *E. coli* transformadas. Carril 1 y 2: ADN plasmídico obtenido a partir de colonias transformadas; MM= Marcador de pares de bases DNA Axygen 1 Kb Ladder Marker^{ee}.

Para identificar las colonias bacterianas portadoras del plásmido con el inserto, se realizó una PCR utilizando los iniciadores diseñados (Figura 11). Asimismo, para corroborar la presencia del inserto, se realizó una segunda PCR con los iniciadores incluidos para el plásmido (Figura 12). En dichas colonias se logró amplificar el fragmento de 667 pb, correspondiente al marco de lectura que codifica a la proteína p25-cápside.

^{ee} Axygen®, California, EUA

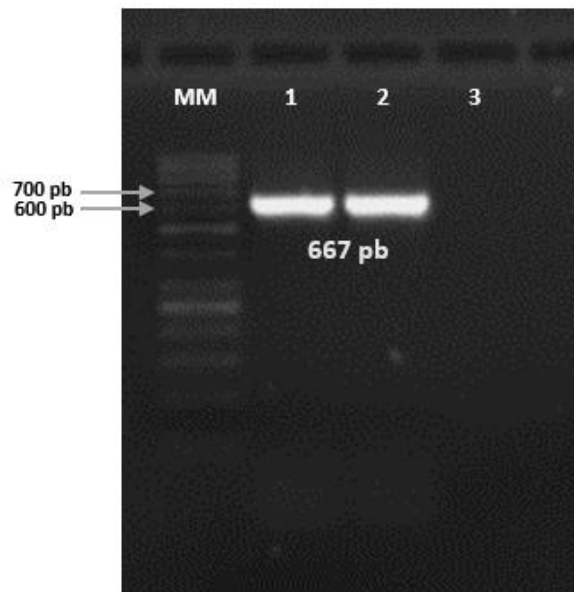


Figura 11. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio donde se observa el producto de amplificación de 667 pb correspondiente al inserto de p25-cápside. Carril 1 y 2: Producto de amplificación de 667 pb, correspondiente al inserto de p25; Carril 3: Control negativo de la reacción. MM= Marcador de pares de bases GeneRuler 50 pb DNA Ladder.

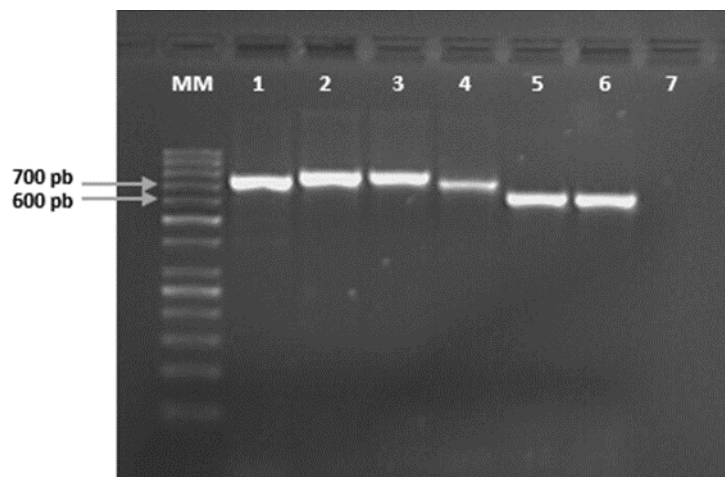


Figura 12. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio donde se muestran diferentes productos de amplificación correspondientes al inserto de p25-cápside. Carril 1: producto de amplificación de 772 pb correspondiente al inserto de p25 (usando Fw-pET y Gag-p25-2); Carril 2-3: productos de amplificación de 798 pb (usando Gag-p25-1 y Rv-pET) correspondientes al inserto de p25; Carril 4: producto de amplificación de 750 pb correspondiente al control de reacción pETSUMO®; Carril 5 y 6: producto de amplificación de 667 pb (usando Gag-p25-1 y Gag-p25-2) correspondiente al inserto de p25;. Carril 7: control negativo de la reacción; MM= Marcador de pares de bases GeneRuler 50 pb DNA Ladder.

Para comprobar que la secuencia en el ADN plasmídico extraído corresponde a p25-cápside, se llevó a cabo su purificación y secuenciación. El análisis de similitud mostró un porcentaje de identidad del 92-94% con el gen *gag*, que codifica para la proteína de la cápside-p25 de LvPR (Figura 13).

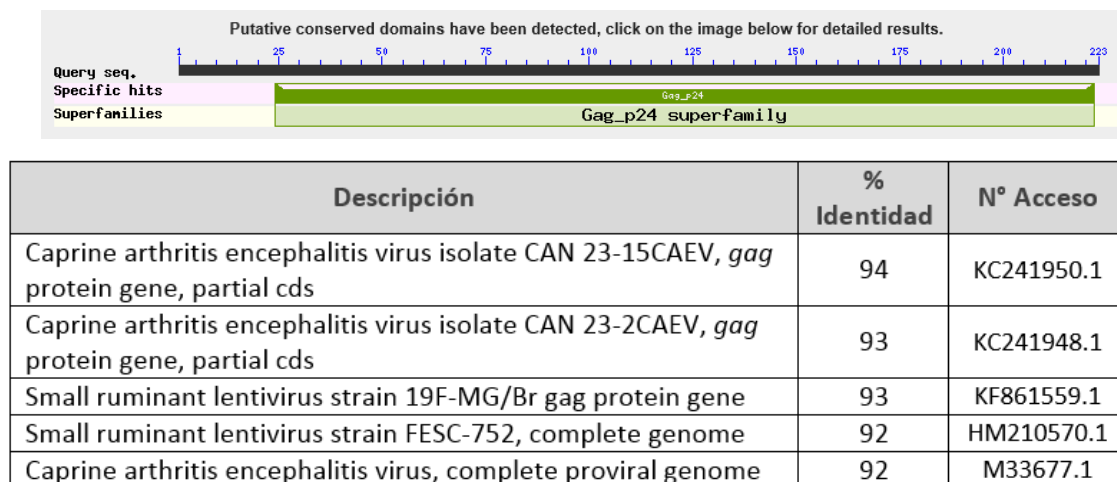


Figura 13. Cuadro que muestra la similitud de secuencias disponibles en el GenBank comparadas con secuencias obtenidas del ADN plasmídico de células transformadas.

Asimismo, para corroborar que el marco de lectura era adecuado para ser expresado en *E. coli* y que la traducción de la proteína sería correcta, a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida se determinó el marco de lectura y el codón de inicio (ATG) en la secuencia generada (Figura 14).

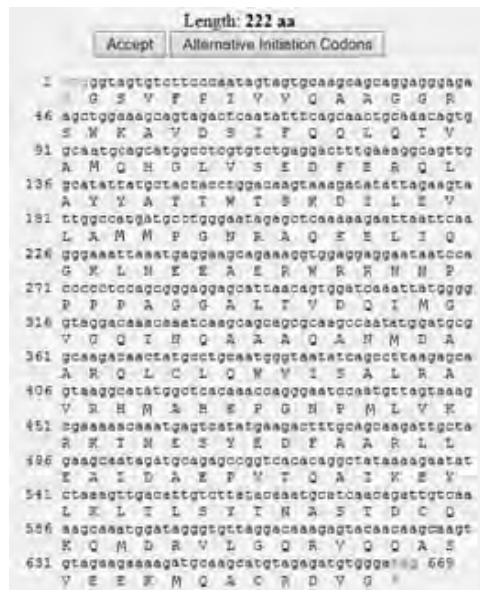


Figura 14. Diagrama donde se muestra el marco de lectura y el codón de inicio en la secuencia obtenida a partir del ADN plasmídico.

7.1.3 Expresión de la proteína recombinante p25-cápside

Se realizó la transformación con el ADN plasmídico en células *E.coli* BL21 (DE3) con la finalidad de expresar la p25-cápside. Se determinó la sobreexpresión de las proteínas a las 2 horas y fueron separadas por electroforesis (Figura 15). Un gel se tiñó con azul de Coomassie y otro se utilizó para transferir las proteínas a una membrana de PVDF (Figura 16).

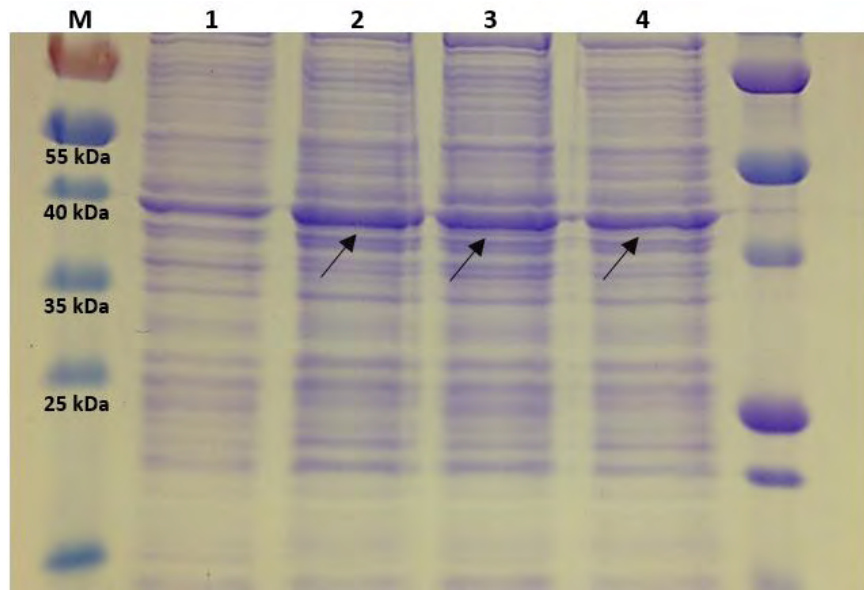


Figura 15. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie (SDS-PAGE) con extractos protéicos de *E.coli* transformadas. Carril 1: extracto sin inducir; Carril 2: extracto inducido con IPTG, fase 1 hora; Carril 3: extracto inducido con IPTG, fase 2 horas; Carril 4: extracto inducido con IPTG, fase 3 horas. Las flechas muestran la expresión de una banda de 38 KDa aproximadamente, correspondiente a la proteína p25-cápside. M: Marcador de peso molecular preteñido.

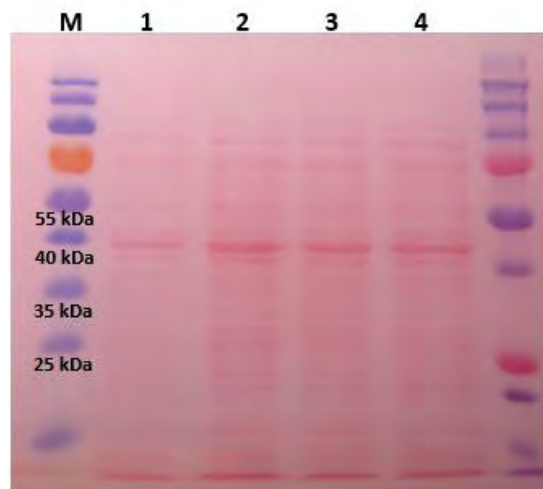


Figura 16. Membrana de PVDF teñida con rojo de Ponceau para visualizar las proteínas transferidas. Carril 1 al 4: proteínas extraídas de *E.coli* transformadas. M: Marcador de peso molecular preteñido.

Una vez realizada la transferencia se llevó a cabo la inmunodetección de las proteínas extraídas, con suero de cabra positivo a LvPR como anticuerpo primario. Las proteínas extraídas del cultivo sin inducir, fueron utilizadas como control en la electroinmunodetección (Figura 17).

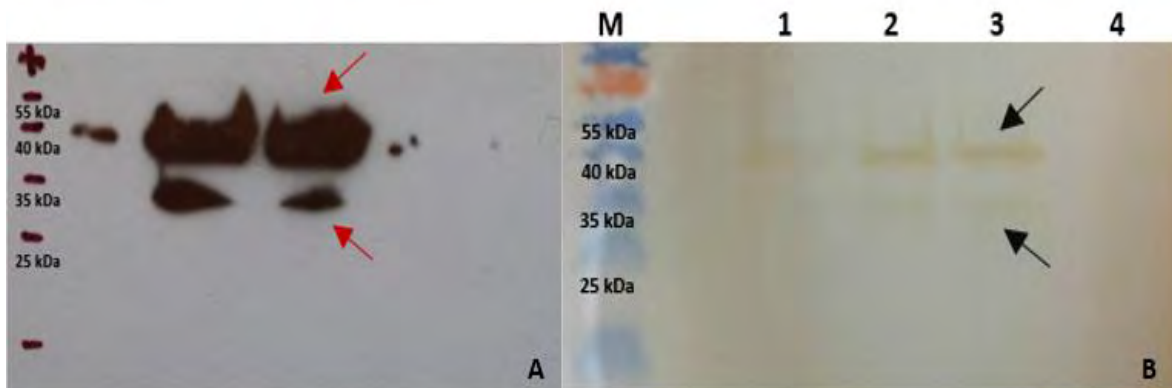


Figura 17. A) Fotografía de una película radiográfica después de revelar, donde se muestra la inmunodetección de la proteína recombinante p25-cápside, a partir de proteínas extraídas del cultivo de *E.coli* BL21 (DE3). **B)** Fotografía de una membrana de PVDF después de revelar. Carril 1 al 3: inmunodetección a partir de extractos protéicos de *E. coli* BL21 (DE3) inducidos con IPTG. Carril 4: inmunodetección a partir de extractos protéicos de *E.coli* BL21 (DE3) sin inducir. M: Marcador de peso molecular preteñido. Las flechas muestran la detección de una banda de 38 KDa y 32 KDa aproximadamente, las cuales corresponden a la proteína recombinante p25-cápside.

Para corroborar que las bandas de 38 y 32 KDa, observadas en el Western blot corresponden a la proteína recombinante p25-cápside de LvPR, estas fueron purificadas utilizando columnas comerciales. Las proteínas purificadas fueron visualizadas mediante en un gel de poliacrilamida (Figura 18) y fueron secuenciadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas (LC-MS/MS).

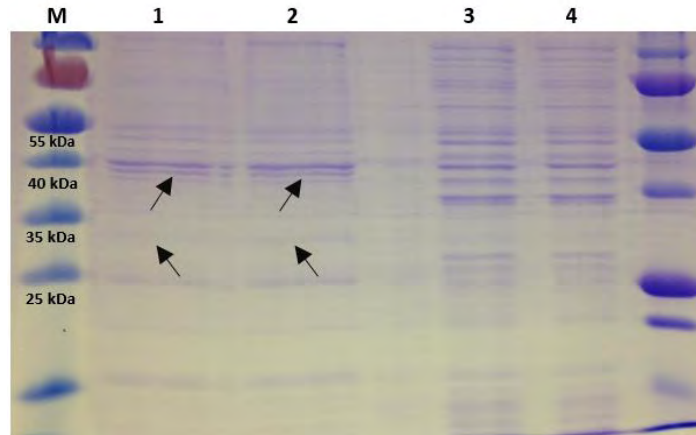


Figura 18. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie (SDS-PAGE), con extractos protéicos de *E.coli* BL21 (DE3) transformadas. Carril 1 y 2: proteínas extraídas a las 2 horas post-inducción con IPTG, después de la purificación. Carril 3 y 4: proteínas extraídas a las 2 horas sin inducir y sin purificar. Las flechas muestran la expresión de una banda de 38 y 32 KDa, correspondientes a la p25. M: Marcador de peso molecular preteñido.

Finalmente, las secuencias recibidas fueron analizadas y se demostró que las dos bandas obtenidas (38 y 32 kDa), corresponden a la proteína p25-cápside de LvPR (Figura 19).

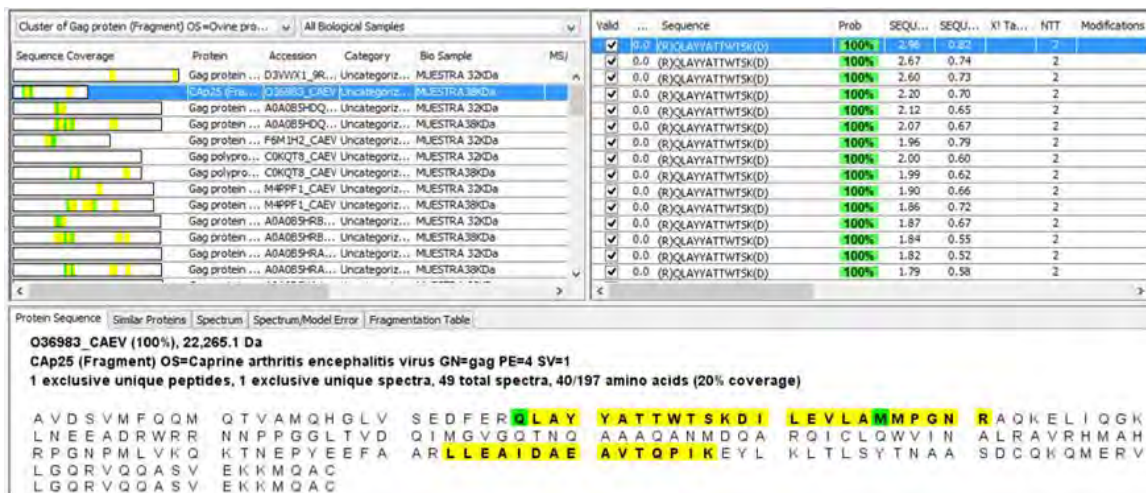


Figura 19. Diagrama donde se muestra algunas de las secuencias obtenidas en la cromatografía para las proteínas de 38 y 32 kDa, así como el porcentaje de homología de las mismas con secuencias previamente reportadas.

La homología de las secuencias, fue comprobada por medio de BLAST del UniProt^{ff} y NCBI (Figura 20 y 21).

Descripción	% Identidad	N° Acceso
Capsid protein p25 [caprine arthritis encephalitis virus]	100	Q7ZSW6
25 kDa major core protein [visna/maedi virus]	100	Q4G5X6
25 kDa major core protein [visna/maedi virus]	100	Q4G5X8
CA p25 [caprine arthritis encephalitis virus]	100	O36983
Capsid protein p25 [caprine arthritis encephalitis virus]	100	Q8Q2H0
P25 capsid protein [caprine arthritis encephalitis virus]	100	Q108K1

Figura 20. Cuadro que muestra la similitud de secuencias disponibles en el GenBank con la secuencia de la proteína recombinante de 38 KDa, utilizando BLAST de UniProt.

Descripción	% Identidad	N° Acceso
<i>gag</i> protein [small ruminant lentivirus]	100	AJF45396.1
Capsid protein p28 [caprine arthritis encephalitis virus]	96	ABY79131.1
Capsid protein p28 [caprine arthritis encephalitis virus]	96	ABY79128.1
Capsid protein p28 [caprine arthritis encephalitis virus]	96	ABY79129.1
<i>gag</i> polyprotein [small ruminant lentivirus]	96	ACN71176.1

Figura 21. Cuadro que muestra la similitud de secuencias disponibles en el GenBank con la secuencia de la proteína recombinante de 32 KDa, utilizando BLAST de NCBI.

^{ff} <http://www.uniprot.org/>

8. DISCUSIÓN

Diversos trabajos han demostrado que los determinantes antigénicos específicos para cepas de LvPR, no sólo se localizan en las proteínas codificadas por el gen *env* (región altamente variable), sino también en epítomos inmunodominantes de las proteínas del gen *gag* [2, 49, 114].

En algunos estudios se ha reportado que las proteínas codificadas por gen *gag* juegan un papel importante como antígenos inmunodominantes en las infecciones por LvPR, siendo la más importante, la proteína de la cápside (CA-p25) [47, 49, 104, 115, 116, 117, 118].

En Canadá, realizaron un mapeo parcial de epítomos inmunodominantes en cepas circulantes de LvPR, mostrando que al menos dos determinantes antigénicos, localizados en la región N-terminal de la proteína de CA y un tercer epítomo en la región C-terminal de la misma proteína, eran importantes para preservar la antigenicidad de las reacciones cruzadas. El estudio identificó que las cepas de ovinos mantienen conservado el tercer epítomo de su región C-terminal en la secuencia de CA, mientras que en caprinos la región que se mantiene conservada se encuentra en la porción N-terminal de la misma proteína [49]. De igual forma, otros trabajos remarcan la importancia de estos epítomos conservados para preservar el espectro de reacciones cruzadas en el empleo de pruebas serológicas como métodos de detección de la infección por LvPR [49, 114, 115, 116].

En diversos trabajos han utilizado estas proteínas recombinantes y/o secuencias de epítomos inmunodominantes, para la identificación de LvPRs en pruebas serológicas, las cuales han demostrado ser una herramienta de bajo costo y altamente efectiva, mejorando así, la sensibilidad en el diagnóstico y permitiendo una eficiente detección de la infección en una determinada población animal [106, 117, 119]. La obtención de estas proteínas recombinantes mediante la técnica de clonación de genes en el sistema

Escherichia coli, ha permitido la producción en grandes cantidades de antígenos capaces de interactuar con anticuerpos específicos de los sueros animales de animales infectados por LvPR [104, 117].

La proteína de la cápside ha sido utilizada en diversos trabajos como antígeno recombinante para pruebas serológicas, ya que representa una región altamente conservada del genoma que mantiene sus propiedades inmunogénicas; siendo el primer antígeno (dentro de las proteínas codificadas por el gen *gag*) en ser reconocido por la respuesta inmune humoral de ovinos y caprinos infectados con LvPR (entre 21-49 días) y permaneciendo detectable por periodos prolongados (hasta 100 días) [49, 65, 114, 115, 116, 118, 119].

A través de pruebas ELISA se han logrado evaluar sueros provenientes de animales infectados natural y experimentalmente, usando como antígeno la proteína recombinante p25-cápside obtenida a partir de cepas pertenecientes a los subtipos A y B de LvPR. En un estudio se utilizó ésta proteína recombinante (obtenida del subtipo A) para identificar animales infectados y se encontró una sensibilidad y especificidad de 99% y 85%, respectivamente [99, 120]. Mientras que, para el subtipo B, se obtuvo una sensibilidad de 86% y una especificidad de 98% [99, 121]. No obstante, resultados obtenidos en diversos estudios, han demostrado que el uso combinado de la proteína recombinante p25-cápside y gp46-TM en pruebas tipo ELISA, brindan una sensibilidad y especificidad entre el 100% y 98%, respectivamente; valores superiores a los obtenidos utilizando las proteínas recombinantes de manera individual [98, 99, 114, 115].

Si bien, el diagnóstico serológico es el método más usado para la detección de anticuerpos contra los LvPR; actualmente no existen pruebas serológicas diseñadas en el país, para realizar monitoreos constantes de la respuesta humoral hacia estos virus; por lo

que se vuelve necesario evaluar alternativas de diagnóstico locales. Es por ello que en el presente trabajo, la obtención de la proteína recombinante p25-CA, a partir de una cabra infectada con un LvPR circulante en rebaños de la región centro del país, podría brindar la pauta para la elaboración y estandarización de pruebas serológicas utilizando subtipos virales circulantes en caprinos del país y/o en cada región del mismo, asegurando una buena sensibilidad en los resultados de las pruebas diagnósticas.

La proteína recombinante p25-CA tuvo una alta similitud con otros LvPRs del genotipo B1 (circulante en México) descritos en las bases de datos, Shanxi (China, GU120138.1), Gansu (China, AY900630.1), CAEV-CO (EUA, M33677.1) y la cepa reportada en México, FESC-752 (México, HM210570.1).

Para la expresión de la proteína recombinante p25-CA se utilizaron células BL21 (DE3), las cuales contienen el lisogen DE3, el cual favorece la señalización para el inicio de la transcripción y traducción, mediante la inducción de IPTG ^[122]. Asimismo, se utilizó un vector con un promotor de expresión fuerte acoplado a la proteína de fusión SUMO (small ubiquitin-like modifier) con marcaje de seis histidinas (6xHis) en la región N-terminal, lo cual permite la expresión, purificación y generación de proteínas nativas en *E. coli* ^[123].

La proteína obtenida mediante *E. coli* fue purificada a través de columnas comerciales y empleada en la inmunodetección, para evaluar sus propiedades inmunogénicas y determinar si los anticuerpos provenientes de animales infectados por LvPR eran capaces de reconocerla.

La purificación de la proteína se realizó mediante el uso de polihistidinas en una resina de níquel, éstas se caracterizan por tener pobres propiedades inmunogénicas, lo que favorece la inmunodetección de la proteína recombinante ^[122]. Las proteínas de fusión marcadas con glutatión-S-transferasa (GST), son ampliamente usadas en los sistemas de

recombinación para la purificación de proteínas recombinantes ^[100, 117]. Sin embargo, en algunos animales se pueden presentar reacciones cruzadas con la GST; de manera que los sueros deben ser evaluados, no sólo contra el antígeno recombinante si no también contra la GST ^[122].

La proteína recombinante producida fue visualizada en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), en el cual se observó una banda de 38 KDa, este aumento en el peso molecular (la proteína p25-CA tiene un peso molecular de 25 kDa) está relacionado con la adición de la proteína de fusión SUMO y la presencia de histidinas en la región N-terminal de la proteína recombinante, aumentando hasta 13 KDa. Este resultado fue similar a la banda encontrada en el Western Blot. No obstante, aunado a esta banda, se obtuvo otra de 32 KDa. Los análisis para la caracterización de estas proteínas mediante LC-MS/MS, identifican a las dos bandas como proteínas de *gag-p25*. Esto podría deberse a la traducción de otra metionina (ATG) en la proteína, cambiando con ello el inicio de la proteína recombinante y por consecuencia el tamaño de la misma ^[124]. Adicionalmente puede suceder un proceso de dimerización en el gel de poliacrilamida, lo que ocasiona una migración errática de la proteína ^[125].

En algunos experimentos con SDS-PAGE, se han identificado procesos de dimerización o incluso oligomerización de algunas proteínas (GpA, MS1, etc), lo cual se visualiza en la presencia de dos o más bandas. Este efecto podría ser causado por la poca interacción entre el péptido y el detergente, ocasionando diferencias en la movilidad electroforética, lo cual se observa en la migración de bandas con diferente peso molecular ^[125].

Otra posibilidad que podría explicar la diferencia de peso entre estas bandas, puede relacionarse con alguna alteración post traduccional de la proteína por parte de la bacteria. Las alteraciones post traduccionales pueden representar una estrategia

importante para modular la función y la vida media de estas proteínas. Sin embargo, se ha reportado que la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) carece de dos proteasas relevantes en estos procesos, Lon y OmpT ^[126, 127]. No obstante, no podría descartarse otra proteasa de la bacteria, que interfiera en la obtención intacta de la proteína recombinante.

Finalmente, el análisis del Western blot revela el reconocimiento por anticuerpos contra la proteína recombinante p25-CA, indicando que esta proteína mantiene sus epítomos inmunodominantes y es capaz de ser reconocida por los anticuerpos de dos animales infectados.

En diversas ocasiones, el suero de los animales puede tener altos niveles de anticuerpos dirigidos a antígenos bacterianos (como *Escherichia coli*), presentando resultados falsos positivos en algunas pruebas serológicas. Esta situación, fue eliminada mediante la adsorción del suero ^[113].

Además de la proteína viral p25-CA, es recomendable incluir en las pruebas serológicas las proteínas p17 y p14 (p17-MA/p14-NC) del gen *gag*, las cuales también presentan epítomos inmunodominantes, lo cual mejora la eficacia en el diagnóstico. Las proteínas codificadas por el gen *gag* han sido usadas en el diagnóstico temprano para la detección de anticuerpos durante varios años, sin embargo, han emergido nuevos genotipos, lo que conlleva a desarrollar nuevas técnicas de ELISA que utilizan proteínas derivadas de los genes *gag* y *env* de por lo menos tres genotipos diferentes (A, B y E) ^[43, 60, 72]. Asimismo, la adición de péptidos sintéticos en el ELISA también han sido de utilidad en el diagnóstico de LvPR; péptidos basados en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la proteína SU (SU V5) han demostrado tener una alta sensibilidad, convirtiéndose en pruebas confiables para la detección y control de la infección, tal como sucedió en la campaña de erradicación de Suiza en 1980, donde se disminuyó la

seroprevalencia de un 80% al 1%, la cual actualmente se mantiene. De igual manera, un estudio reveló que 8,000 sueros negativos, obtenidos de cabras pertenecientes a una granja libre de LvPR, al realizar el ELISA con péptidos derivados de la región SUV5, más del 10% de los animales resultaron seropositivos ^[2]. Estos hallazgos, han brindado la pauta para la elaboración de pruebas serológicas más específicas para la detección de LvPR ^[11, 114].

Hasta ahora, no existe ninguna técnica que pueda ser propuesta como una “prueba de oro” para determinar el estatus de la infección en un animal o población ^[49, 110]. Los métodos de ELISA competitivos comerciales para ovinos y caprinos (ELISAc de VMRD), utilizan anticuerpos monoclonales contra los epítomos de la proteína viral de envoltura gp135 (SU-gp135) ^[43, 98]. Actualmente, se han estandarizado diferentes ELISAs indirectos, usando virus completo como antígeno (AG-CHEKIT) o proteínas recombinantes más algunos péptidos como la proteína p25-CA y el péptido TM (gp46-TM del genotipo A), utilizados en la prueba comercial Elitest-MVV (HYPHEN Biomed, Neuville-sur-Oise, France) y Pourquoi (ELISA Maedi-Visna/CAEV serum verification Institut Pourquoi, Montpellier, France) ^[43, 98, 128]. Sin embargo, en algunos casos, productos antigénicos de una sola cepa no logran cubrir por completo el espectro antigénico de los LvPR, haciendo la detección de la infección poco eficiente. Es por ello que la información actualizada de los subtipos virales circulantes en cada país y/o región es de crucial importancia para asegurar los resultados de las pruebas diagnósticas ^[49].

9. CONCLUSIONES

Se amplificó y secuenció un fragmento del gen *gag* correspondiente a la proteína p25-CA, de una cepa de LvPR circulante en un hato caprino del centro de México. La cual se clonó en el sistema de *Escherichia coli* para la expresión de dicha proteína. El sistema de *Escherichia coli* fue capaz de permitir la expresión de la proteína recombinante p25-CA de LvPR.

Con la técnica de Western Blot, se detectó la inmunoreactividad de la proteína recombinante p25 local, con lo que se podría afirmar que dicha proteína mantiene epítomos inmunodominantes.

LITERATURA CITADA

1. Quérat G and Vigne R. Caprine Arthritis Encephalitis Virus (*Retroviridae*), in: Granoff A, Webster RG editors. *Encyclopedia of Virology*. 2nd Ed. Vol. I. Academic Press. USA. 1999, 223-229.
2. Bertoni G. Caprine Arthritis Encephalitis Complex, in: Tempesta M editor. *Recent Advances in Goat Diseases*. International Veterinary Information Service. USA. 2007.
3. Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, Cork LC. Chronic Arthritis in Goats Caused by a Retrovirus. *Science* 1980; 207: 997-999.
4. Saltarelli M, Quérat G, Konings DAM, Vigne R, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 1990; 179: 347-364.
5. The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University. Caprine Arthritis and Encephalitis. Caprine Arthritis-Encephalitis, Small Ruminant Lentivirus Infection. [Update 2007; cited 5 august 2015]. Available from:

http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/capriner_arthritis_encephalitis.pdf
6. Christodoulopoulos G. Maedi–Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Rumin Res* 2006; 62: 47-53.
7. Martínez RHA. Artritis Encefalitis Caprina. Curso Bases de la Cría Caprina. El Trópico, una Alternativa para la Producción Caprina. Coatepec (Veracruz) México. 2010.
8. Larruskain A, Jugo BM. Retroviral Infections in Sheep and Goats: Small Ruminant Lentiviruses and Host Interaction. *Viruses* 2013; 5: 2043-2061.

9. Blacklaws BA. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012; 35: 259-269.
10. Martínez RHA, Lazcano RMA, Ramírez AH, Sánchez GJH y Díaz AE. Detección de anticuerpos en machos a lentivirus de pequeños rumiantes (estudio preliminar). Memorias XXVI Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Encuentro Nacional de Caprinocultores. Querétaro (Querétaro) México. 2011.
11. Peterhans E, Greenland T, Badiola J, Harkiss G, Bertoni G, Amorena B *et al.* Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res* 2004; 35: 257-274.
12. Pisoni G, Bertoni G, 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. *J Virol* 2007; 81: 4948-4955.
13. 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.
14. 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. *Arch Virol* 1997; 142: 1125-1137.
15. Castro SR, Greenland T, Leite CR, Gouveia A, Mornex JF, Cordier G. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis–encephalitis virus and visna–maedi virus. *J Gen Virol* 1999; 80: 1583-1589.

16. Shah C, Huder JB, Böni J, Schönmann M, Mühlherr J, Lutz H *et al.* Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Viceversa. *J Virol* 2004; 78: 7518-7522.
17. Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Manual de la OIE sobre los Animales Terrestres 2008. Capítulo 2.7.3. Artritis Encefalitis Caprina y Maedi-Visna. [En línea 2009; citado 5 agosto 2015]. Disponible en:

http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.07.03-04.%20Artritis-Encefalitis%20caprina%20y%20Maedi%20Visna.pdf
18. Tesoro CE, Hernández GR, Martínez RHA, Ramírez AH, Trujillo OME, Kretschmer SR *et al.* Detección de anticuerpos contra artritis encefalitis caprina (AEC) mediante inmunoelectrotransferencia. *Vet Méx* 2003; 34: 119-127.
19. Leyva GVH, Martínez RHA, González RG, Cornejo CMA, Rosales ME, Garrido FG *et al.* Identificación del virus de la artritis encefalitis caprina mediante el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural, en tejidos de cabras seropositivas en México. *Rev Latinoam Microbiol* 1998; 40: 33-38.
20. Greenwood PL. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev Vet Med* 1995; 22: 71-82.
21. Keen JE, Hungerford LL, Littledike ET, Wittum TE, Kwang J. Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity. *Prev Vet Med* 1997; 30: 155-169.
22. Adams DS, Oliver RE, Ameghino E, DeMartini JC, Verwoerd DW, Houwers DJ *et al.* Global survey of serological evidence of caprine-arthritis encephalitis virus infection. *Vet Rec* 1984; 115: 493-495.

23. Morin T, Mselli-Lakhal L, Bouzar B, Hoc S, Guiguen F, Grezel D *et al.* Le virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine (CAEV) et la barrière d'espèce. *Virologie* 2002; 6: 279-291.
24. Guiguen F, Mselli-Lakhal L, Durand J, Du J, Favier C, Fornazero C *et al.* Experimental infection of Mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 2000; 61: 456-461.
25. Stonos N, Wootton SK, Karrow N. Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral Infections. *Viruses* 2014; 6: 3311-3333.
26. Heaton PM, Kalbfleisch ST, Petrik TD, Simpson B, Kijas WJ, Clawson LM *et al.* Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. *PLoS One* 2013; 8: e55490.
27. Nazara S, Trigo FJ, Suberbie E y Madrigal V. Informe Preliminar sobre la Prevalencia de la Artritis-Encefalitis Caprina en México. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1983. México (DF) México. 1983.
28. Nazara S, Trigo FJ, Suberbie E, Madrigal V. Estudio clínico-patológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Vet Méx* 1985; 16: 91-100.
29. Torres-Acosta JFJ, Gutiérrez-Ruiz EJ, Butler V, Schmidt A, Evans J, Babington J *et al.* Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. *Small Rumin Res* 2003; 49: 207-211.
30. Ramírez C y Trigo FJ. Informe Preliminar sobre la Seroprevalencia de la Neumonía Progresiva Ovina en México. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1983. México (DF) México. 1983.

31. Pérez SA. Identificación de anticuerpos contra proteínas de lentivirus en machos ovinos, por las técnicas de inmunoelectrotransferencia (western blot) y ELISA indirecta. (Tesis de Licenciatura). Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México: UNAM 2005.
32. Ramírez H, Glaria I, de Andrés D, Martínez HA, Hernández MM, Reina R *et al.* Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *Vet J* 2011; 190: 169-172.
33. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Diario Oficial de la Federación (DOF). Las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. [En línea septiembre 2007; citada el 5 agosto 2015]. Disponible en:
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5001157&fecha=20/09/2007
34. Nazara S, Trigo FJ, Suberbie E, Madrigal V. Estudio Serológico de la Artritis-Encefalitis Caprina en México. *Téc Pec Méx* 1985; 48: 98-101.
35. Salazar OL, Rangel C, Flores N, López RR. La artritis-encefalitis caprina: amenaza de la caprinocultura potosina. Pulso del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica 2003; Sec Tertio Millenio.
36. Daltabuit M, De la Concha BA, Espinosa LEL, Loza E, Setién A. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can J Vet Res* 1999; 63: 212-215.
37. Hernández RSG. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la presencia de artritis encefalitis caprina en la zona centro del estado de Veracruz. (Tesis de Maestría). Veracruz, México: Univ Veracruzana 2011.

38. Hunter E. Retroviruses: General Features, in: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV editors. *Encyclopedia of Virology*. 3th Ed. Vol. IV. Academic Press. USA. 2008, 459-467.
39. Goff PS. Retroviridae: The Retroviruses and their Replication, in: Knipe MD, Howley MP editors. *Fields Virology*. 5th Ed. Vol. I. Lippincott Williams & Wilkinis. USA. 2007, 2000-2069.
40. Villet S, Bouzar BA, Morin T, Verdier G, Legras C, Chebloune Y. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis Encephalitis Virus Genomes Encode a Vpr-Like but No Tat Protein. *J Virol* 2003; 77: 9632-9638.
41. Tang H, Kugen KL, Wong-Staal F. Lentivirus Replication and Regulation. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 133-170.
42. Freed OE. HIV-1 Replication. *Somat Cell Mol Genet* 2001; 26: 13-33.
43. Ramírez H, Reina R, Amorena B, de Andrés D, Martínez HA. Small Ruminant Lentiviruses: Genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses* 2013; 5: 1175-1207.
44. Buchschacher LG. Introduction to Retroviruses and Retroviral Vectors. *Somat Cell Mol Genet* 2001; 26: 1-11.
45. Arhel N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 2010; 7: 96.
46. Galetto R and Negroni M. Retroviruses, in: Cameron CE, Götte M and Raney KD editors. *Viral Genome Replication*. Springer Science. USA. 2009, 109-128.
47. Olech M, Luszczak-Rola M, Kozaczynska B, Kubis P, Pluta A, Gil A, Kuzmak J. Diversity of gag gene sequence encoding immunodominant epitope on capsid protein of lentiviruses from sheep in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy* 2012; 56: 431-434.

48. Minardi da Cruz JC, Singh KD, Lamara A, Chebloune Y. Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) Break the Species Barrier to Acquire New Host Range. *Viruses* 2013; 5: 1867-1884.
49. Santry LA, de Jong J, Gold AC, Walsh SR, Menzies PI, Wootton SK. Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario, Canada. *Virus Res* 2013; 175: 30-44.
50. Bruett L, Barber SA, Clements JE. Characterization of a Membrane-Associated Protein Implicated in Visna Virus Binding and Infection. *Virology* 2000; 271: 132-141.
51. Crane SE, Buzy J, Clements JE. Identification of Cell Membrane Proteins That Bind Visna Virus. *J Virol* 1991; 65: 6137-6143.
52. Dalziel RG, Hopkins J, Watt NJ, Dutia BM, Clarke HA, McConnell I. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *J Gen Virol* 1991; 72: 1905-1911.
53. Lyall JW, Solanky N, Tiley LS. Restricted species tropism of maedi–visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *J Gen Virol* 2000; 81: 2919-2927.
54. Hovden AO, Sommerfelt MA. The influence of CD4 and CXCR4 on maedi-visna virus-induced syncytium formation. *APMIS* 2002; 110: 697-708.
55. Crespo H, Reina R, Glaria I, Ramírez H, de Andrés X, Jáuregui P *et al.* Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet Res* 2011; 42: 28.
56. Crespo H, Jáuregui P, Glaria I, Sanjosé L, Polledo L, García-Marín JF *et al.* Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis. *Vet Res* 2012; 43: 43.

57. Didigu CA, Doms RW. Novel Approaches to Inhibit HIV Entry. *Viruses* 2012; 4: 309-324.
58. Buzon V, Natrajan G, Schibli D, Campelo F, Kozlov MM, Weissenhorn W. Crystal Structure of HIV-1 gp41 Including Both Fusion Peptide and Membrane Proximal External Regions. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000880.
59. Wilks D. The CD4 receptor: Post binding events, conformational change and the second site. *Molec Aspects Med* 1991; 12: 255-265.
60. Warren K, Warrilow D, Meredith L, Harrich D. Reverse Transcriptase and Cellular Factors: Regulators of HIV-1 Reverse Transcription. *Viruses* 2009; 1: 873-894.
61. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA Integration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006890.
62. Sundquist WI, Kraüsslich HG. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006924.
63. Villet S, Faure C, Bouzar BA, Morin T, Verdier G, Chebloune Y *et al.* Lack of trans-activation function for Maedi Visna virus and Caprine arthritis encephalitis virus *tat* proteins. *Virology* 2003; 307: 317-327.
64. Shah C, Böni J, Huder JB, Vogt HR, Mühlherr J, Zanoni R *et al.* 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.

65. Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, Muz D, Rosati S. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J Gen Virol* 2007; 88: 3423-3427.
66. Elfahal AM, Bakheit MA, Mohammed ZA, Elhussein AM. Partial characterization of small ruminant lentiviruses from goat from Sudan based on gag gene sequence analysis. *J Anim Vet Adv* 2010; 9: 1804-1810.
67. Quérat G, Audoly G, Sonigo P, Vigne R. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology* 1990; 175: 434-447.
68. Sargan DR, Bennet ID, Cousens C, Roy DJ, Blacklaws BA, Dalziel RG *et al.* Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 1991; 72: 1893-1903.
69. Bertolotti L, Mazzei M, Puggioni G, Carrozza ML, Dei Giudici S, Muz D *et al.* Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. *J Gen Virol* 2011; 92: 1923-1929.
70. Gjerset B, Storset AK, Rimstad E. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J Gen Virol* 2006; 87: 573-580.
71. Reina R, Mora MI, Glaria I, García I, Solano C, Luján L *et al.* Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res* 2006; 121: 189-198.

72. Reina R, Bertolotti L, Dei Giudici S, Puggioni G, Ponti N, Profiti M *et al.* Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet Microbiol* 2010; 144: 24-31.
73. Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Brogden KA, Bolin SR. Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *Am J Vet Res* 1985; 46: 326–328.
74. Mselli-Lakhal L, Guiguen F, Fornazero C, Du J, Favier C, Durand J *et al.* Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. *Virology* 1999; 259: 67–73.
75. Greenwood PL, North RN, Kirkland PD. Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales. *Aust Vet J* 1995; 72: 341-345.
76. East NE, Rowe JD, Dahlberg JE, Theilen GH, Pedersen NC. Modes of transmission of caprine arthritis encephalitis virus infection. *Small Rumin Res* 1993; 10: 251-262.
77. Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Whipp SC. Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus. *Am J Vet Res* 1981; 42: 1795–1797.
78. Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Whipp SC, McClurkin AW. Effects on ovine fetuses of exposure to ovine progressive pneumonia virus. *Am J Vet Res* 1982; 43: 82–85.
79. Fieni F, Rowe JD, Van Hoosear K, Burucoa C, Oppenheim S, Anderson G *et al.* Presence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology* 2003; 59: 1515-1523.
80. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 1983; 44: 1670-1675.

81. Georgsson G, Petursson G, Miller A, Nathanson N, Palsson PA. Experimental visna in foetal Icelandic sheep. *J Comp Pathol* 1978; 88: 597-605.
82. De la Luz AJ, Rivera BJF, Soberón MA, Ramírez MH, Ducoing WAE. Cinética de la infección natural del virus de la artritis encefalitis caprina en cabritos en un sistema intensivo de producción. Memorias de la XXVIII Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Huajolotitlán (Oaxaca) México. 2015.
83. De la Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ, DeMartini JC. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am J Vet Res* 1996; 57: 684-688.
84. Travassos C, Benoit C, Valas S, Da Silva A, Perrin G. Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement. *Vet Res* 1998; 29: 579-584.
85. Ortiz SOR, Martínez RHA, Ramírez AH, García FMM y Díaz AE. Detección de anticuerpos a lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) en líquido seminal. Memorias XXVI Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Encuentro Nacional de Caprinocultores. Querétaro (Querétaro) México. 2011.
86. Costa SK, Rizaldo PR, Oliveira SD, Lomonte LR, de Souza RA, Helena SL et al. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination.
87. Leroux C, Vuillermoz S, Mornex JF, Greenland T. Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *J Gen Virol* 1995; 76: 1533-1537.

88. Valas S, Benoit 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.
89. Germain K, Valas S. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. *Virus Res* 2006; 120: 156-162.
90. Ryan S, Tiley L, McConnell I, Blacklaws B. Infection of Dendritic Cells by the Maedi-Visna Lentivirus. *J Virol* 2000; 74: 10096-10103.
91. Gorrell MD, Brandon MR, Sheffer D, Adams RJ, Narayan O. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. *J Virol* 1992; 66: 2679-2688.
92. Gendelman HE, Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Kennedy PGE, Ghotbi Z, Clements JE *et al.* Tropism of Sheep Lentiviruses for Monocytes: Susceptibility to Infection and Virus Gene Expression Increase during Maturation of Monocytes to Macrophages. *J Virol* 1986; 58: 67-74.
93. Turin L, Pisoni G, Giannino ML, Antonini M, Rosati S, Ruffo G, Moroni P. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. *Small Rumin Res* 2005; 57: 73-79.
94. Leitner G, Krifucks O, Weisblit L, Lavi Y, Bernstein S, Merin U. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet J* 2010; 183: 328-331.
95. Martínez NV, Peris RC, Roche JML, Caballero GC. Efectos del virus de la artritis-encefalitis caprina sobre la producción y composición de la leche en cabras murciano-

granadinas. Memorias XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valencia, España. 2002.

96. Martínez NV, Peris RC, Gómez EA, Peris B, Roche ML, Caballero C *et al.* Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Vet J* 2013; 197: 311-317.

97. Ryan DP, Greenwood PL, Nicholls PJ. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl- β -glucosaminidase activity in dairy goats. *J Dairy Res* 1993; 60: 299-306.

98. Knowles DP. Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997; 13: 1-11.

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

100. Rosati S, Kwang J, Tolari F, Keen JE. A comparison of whole virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. *Vet Res Commun* 1994; 18: 73-80.

101. Motha MX, Ralston JC. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Vet Microbiol* 1994; 38: 359-367.

102. Pasick J. Use of a recombinant maedi-visna virus protein ELISA for the serologic diagnosis of lentivirus infections in small ruminants. *Can J Vet Res* 1998; 62: 307-310.

103. Simard C, Twinomwe MK, Singh P, Dixon P. Simple and Rapid Method for Production of Whole-Virus Antigen for Serodiagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis

Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 352-356.

104. Houwers DJ, Nauta IM. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Vet Microbiol* 1989; 19: 127-139.

105. Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, DeRock E, Pedersen NC. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1858-1862.

106. Baba SS, Fotabe AI, Baba MM, Rimstad. Preliminary survey for antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) using recombinant GAG proteins: studies among small ruminant populations in north-eastern Nigeria. *Small Rumin Res* 2000; 37:137-140.

107. Zhang Z, Watt NJ, Hopkins J, Harkiss G, Woodall CJ. Quantitative analysis of maedi visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J Virol Methods* 2000; 86: 13-20.

108. Eltahir YM, Dovas CI, Papanastassopoulou M, Koumbati M, Giadinis N, Verghese-Nikolakaki S, Koptopoulos G. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *J Virol Methods* 2006; 135: 240-246.

109. Glaria I, Reina R, Ramírez H, de Andrés X, Crespo H, Jauregui P *et al.* Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Vet Microbiol* 2012; 155: 136-146.

110. Reina R, Berriatua E, Lujan L, Juste R, Sánchez A, de Andrés D, Amorena B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *Vet J* 2009; 182: 31-37.
111. Rowe JD, East NE. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis encephalitis virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997; 13: 35-53.
112. Sambrook J, Russell DW editors. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: Midipreparation. In: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 3th Ed. Vol 1. Cold spring harbor laboratory press. USA. 2001, 1.35-1.37.
113. Graber A, Zingales B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques* 1995; 19: 28-30.
114. Grego E, Profiti M, Giammarioli M, Giannino L, Rutili D, Woodall C, Rosati S. Genetic Heterogeneity of Small Ruminant Lentiviruses Involves Immunodominant Epitope of Capsid Antigen and Affects Sensitivity of Single-Strain-Based Immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 828-832.
115. Rosati S, Profiti M, Lorenzetti R, Bandecchi P, Mannelli A, Ortoffi M *et al.* Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections. *J Virol Methods* 2004; 121: 73-78.
116. Rosati S, Mannelli A, Merlo T, Ponti N. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res* 1999; 61: 177-183.
117. Zanoni RG, Nauta IM, Pauli U, Peterhans E. Expression in *Escherichia coli* and Sequencing of the Coding Region for the Capsid Protein of Dutch Maedi-Visna Virus

Strain ZZV 1050: Application of Recombinant Protein in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Caprine and Ovine Lentiviruses. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1290-1294.

118. Singh I, McConnell I, Blacklaws B. Immune Response to Individual Maedi-Visna Virus gag Antigens. *J Virol* 2006; 80: 912-916.

119. Fonseca C, Soares G, Requiao AC, Alves J, Martins D, Sardi SI. Monoclonal antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus epitopes in the p28 and p55gag viral proteins. *J Virol Methods* 2013; 187: 352-356.

120. Clavijo A, Thorsen J. Serologic diagnosis of caprine arthritis-encephalitis by ELISA with two recombinant proteins in a parallel testing format. *J Immunoassay* 1995; 16: 419-436.

121. Kwang J, Keen J, Cutlip RC, Kim HS, De la Concha BA. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Rumin Res* 1995; 16: 171-177.

122. Molinková D. Purification of *Escherichia coli*-expressed HIS-tagged Maedi-Visna p25 core antigen by Ni²⁺-chelate affinity chromatography. *Vet Med Czech* 2001; 46: 50-54.

123. Satakarni M and Curtis R. Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. *Protein Expr Purif* 2011; 78: 113-119.

124. Aguilar MEM. Expresión del gen HN del virus del síndrome del ojo azul en sistemas heterólogos. (Tesis de Maestría). México, D.F. CINVESTAV-IPN. 2001.

125. Walkenhorst WF, Merzlyakov M, Hristova K, Wimley WC. Polar residues in transmembrane helices can decrease electrophoretic mobility in polyacrylamide gels without causing helix dimerization. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788: 1321-1331.
126. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005; 115: 113-128.
127. Gottesman S. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 1996; 30: 465-506.
128. Brinkhof JMA, Houwers DJ, van Maanen C. Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infection using the ELISTEST-MVV ELISA. *Small Rumin Res* 2007; 70: 194-197.