



Universidad Nacional Autónoma de México.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“Detección de DNA proviral por PCR de Lentivirus de Pequeños
Rumiantes a partir de células del epitelio prepucial y mononucleares en
sementales ovinos y caprinos.”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

Areli Rodríguez Alonso

ASESOR:

Dr. Hugo Ramírez Álvarez

COASESOR:

Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2017



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Detección de DNA proviral por PCR de Lentivirus de Pequeños Rumiantes a partir de células del epitelio prepucial y mononucleares en sementales ovinos y caprinos

Que presenta la pasante: **ARELI RODRÍGUEZ ALONSO**
Con número de cuenta: **30721225-2** para obtener el Título de la carrera: **Medicina Veterinaria y Zootecnista**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de febrero de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Misael Rubén Oliver González	
VOCAL	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	
SECRETARIO	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. María de Lourdes Jara Ramírez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Gerardo Arcila López Tello	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos:

Agradezco a mi asesor Dr. Hugo Ramírez Álvarez, Coasesor Dr. Humberto Alejandro Rodríguez Martínez y a M. C. María Martha García Flores por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado y apoyarme en cada paso, gracias a su guía pude concluir una etapa de mi vida.

Un agradecimiento especial a los productores que permitieron la recolección de muestras, al hospital Centro Médico Siglo XXI y a los médicos encargados del área de inmunología, así como a los productores que ofrecieron su apoyo para la realización de este trabajo.

A mi madre por ser la razón de que todo esto sea posible, por mostrar gran valentía aun en los momentos más difíciles, por enseñarme a luchar por lo que quiero y a mis hermanos por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada momento de la vida, ustedes han sido mi fuerza y mis ganas seguir adelante, este logro es nuestro.

A Oscar Molina porque todos buscamos a alguien en el camino y yo te encontré a ti, gracias por el apoyo brindado y por ser parte importante de mi vida.

A las dos personas más valiosas en mi vida; Daniel Catalán gracias por permitirme crecer profesionalmente, no existen palabras que demuestren todo el cariño y aprecio que te tengo. Daniel Pérez por enseñarme a levantarme aun cuando no hay razones para hacerlo.

A mis mejores amigos por acompañarme en cada paso que he dado en la vida y a pesar de todo seguir ahí cuando los he necesitado, los quiero; Denisse Juárez, Ana Nativitas, Annette Rivera, Montserrat Turrall, Luis Muciño, Juan Hernández.

Por ultimo a mis compañeros de Laboratorio por apoyarme en la realización de este proyecto y por brindarme su amistad.

La perfección no es cosa pequeña
pero está hecha de cosas
pequeñas.

Miguel Ángel Bounarro

Índice	Página
Resumen	1
Historia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes.	2
Epidemiología de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes	2
Situación de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes en México	3
Cuadro clínico en ovinos y caprinos	4
Patogenia	8
Transmisión	10
Diagnóstico	10
Características generales de los lentivirus	12
Replicación	14
Tropismo	15
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivos	21
Material y métodos	22
Resultados	25
Discusión	33
Conclusión	36
Bibliografía	37
Apéndices	41

Resumen

Los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) tienen tropismo hacia células dendríticas y monocitos, en estos últimos la infección permanece latente hasta que se diferencian en macrófagos. El papel que juegan otros tipos celulares que soportan la infección en aparato reproductor no ha sido adecuadamente estudiado. La transmisión vertical de LvPR es la más importante a través del consumo de calostro y/o leche infectada o por la inhalación de aerosoles. Existe evidencia que demuestra la transmisión venérea hacia las hembras por machos ovinos y caprinos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar en machos caprinos y ovinos seropositivos a LvPR, la presencia de provirus en leucocitos de sangre periférica (LSP) y en células epiteliales de prepucio (CEP). Se colectaron muestras de sangre con anticoagulante por punción de la vena yugular de 10 ovinos y 9 caprinos. De estos mismos animales se obtuvieron CEP por medio de lavados utilizando solución de Hank's. Se realizaron frotis celulares y tinción de Papanicolaou para la identificación de células propias del prepucio. De las muestras de sangre se separó por centrifugación el plasma y los LSP. El plasma fue evaluado para la detección de anticuerpos contra LvPR, utilizando dos pruebas de ELISA de tipo comercial y dos ELISAs experimentales (péptidos sintéticos). De los LSP y las CEP se realizó la extracción de ADN utilizando un kit comercial. Para la detección del ADN proviral se realizó una técnica de PCR semianidada que amplificaba un fragmento del gen *env*. Con el método aplicado de obtención de células prepuciales y al teñirlas con Papanicolaou se observaron células parabasales, intermedias, superficiales y polimorfonucleares. Con las pruebas serológicas se identificaron 7 animales positivos (4 ovinos y 3 caprinos), mostrando en los caprinos una detección homogénea por las técnicas serológicas empleadas. Los resultados obtenidos en la técnica de PCR identificaron un mayor número de animales infectados (n=14). Específicamente se identificó ADN proviral en células epiteliales de prepucio en 4 ovinos y 5 caprinos, demostrando la susceptibilidad de estas células a la infección por LvPR. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demuestra que las CEP son susceptibles a infectarse por LvPR y pueden estar favoreciendo la transmisión venérea en las hembras por machos ovinos y caprinos infectados.

Historia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes.

En 1933 se importaron 20 ovejas de raza karakul a Islandia procedentes de Alemania y en un plazo de 2 años, aparecieron dos enfermedades, denominadas maedi (disnea) y visna (emaciación), causando muertes de ovinos (Minguijón et. al., 2015). La infección fue clasificada como lenta y de curso prolongado y fue inicialmente descrita en Islandia por el científico Sigurdson en 1954 (Straub, 2004).

En 1974 se reconoció en Estados Unidos de América una infección mucho más importante en las cabras (Nazara, 1985), la cual fue denominada como leucoencefalomielitis-caprina, posteriormente se reconocía como leucoencefalomielitis-artritis-caprina, y fue hasta 1979 que el agente retroviral fue descrito por primera vez por Cork, denominándolo como Virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC). Fue aislado de cabras con sinovitis y parálisis en 1980 (Crawford, 1980 y Minguijón et. al., 2015). En México la infección por VAEC se reconoció por primera vez en 1985 (Adams, 1984 y Nazara, 1985).

El Virus de Maedi Visna (VMV) y Artritis Encefalitis Caprina (AEC) actualmente se han incluido en un solo grupo denominado como Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR), causan enfermedad inflamatoria crónica con lesiones degenerativas en una gran variedad de órganos blancos (Cortez-Romero et. al., 2013).

Epidemiología de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes

Los LvPR están distribuidos en todo el mundo, se localiza con mayor frecuencia en sistemas de producción intensivos, principalmente en África, América, Asia y Europa (Cortez-Romero et. al., 2013 y Travassos et al., 1998).

La importación y el intercambio de pequeños rumiantes procedentes de países con una alta prevalencia han contribuido a la propagación de la infección de LvPR a diferentes áreas del mundo y México. La introducción de animales con el objetivo de mejorar la genética en sistemas de producción lechera estabulados ha incrementado la infección dentro de los rebaños nacionales (Lazcano, 2013).

Actualmente los LvPR se clasifican en cinco grupos principales de la “A” a la “E”, diferenciados en un 25-37% en su composición de nucleótidos. El grupo A contiene 15 subtipos (A1-A15) y el grupo B contiene 3 subtipos (B1-B3); en el grupo A, los subtipos 1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12 y 13, se han detectado en ovinos y caprinos, A2 y A15 solo en ovinos y los subtipos 7, 8, 10 y 14 en caprinos. El grupo B se ha detectado tanto en ovinos como caprinos, el grupo C también se ha identificado en ambas especies, pero sólo en Noruega, el grupo D se ha descrito solo en España y Suiza en ambas especies, y el grupo E está dividido en dos subtipos E1 y E2 encontrándose solo en caprinos en Italia y Turquía (Fras et al., 2013).

Situación de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes en México

De acuerdo a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2016) la infección por el VMV y el virus de la AEC están considerados en el grupo 3 de notificación mensual obligatoria a las dependencias oficiales de salud animal y sanidad acuícola del país.

En México, la infección por LvPR fue identificada mediante pruebas serológicas en cabras en 1984 en un estudio que incluyó sueros de varios países, demostrando una seropositividad menor del 10% para el país (Adams et al., 1984). Mediante la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) se evaluaron sueros de los estados de Guanajuato, Guerrero, Michoacán, Querétaro y Sonora encontrándose un 28% de seropositividad (Álvarez, 1984). Ramírez et al., (2011) identificaron el genotipo B1 en ovinos y caprinos infectados con LvPR en rebaños nacionales.

Lazcano en el 2013 identificó mediante serología la infección de LvPR en machos de rebaños ovinos y caprinos de diferentes estados de la República como Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Estado de México y Querétaro, utilizando una prueba comercial de ELISA competitiva. La frecuencia de infección por LvPR de caprinos y ovinos en los diferentes estados se muestran en el cuadro 1 (Lazcano, 2013).

Cuadro 1.- Frecuencia serológica de la infección de LvPR en diferentes estados de la República Mexicana.

Estado	Caprinos		% Seropositivos	Ovinos		% Seropositivos
	+	-		+	-	
Coahuila	5	23	17.9	0	0	0
Guanajuato	50	312	3.8	0	0	0
Hidalgo	6	9	40	13	142	8.4
Oaxaca	0	39	0	0	32	0
Puebla	1	22	4.3	0	0	0
Edo de México	5	7	41.7	0	0	0
Querétaro	5	4	55.6	0	0	0

Lazcano, 2013.

Aguilar en 2015 realizó estudios con ELISAs de péptidos sintéticos detectando anticuerpos en plasmas de ovinos y caprinos infectados con LvPR en el Estado de México, encontrando 86% de animales positivos con el péptido utilizado, mostrando alta prevalencia de la infección en el rebaño estudiado de dicho estado.

Las infecciones por LvPR son de mayor importancia en sistemas intensivos dedicados a la producción de leche, debido a que afectan negativamente la calidad de la leche y aumentan el número de células somáticas. Además del sacrificio prematuro de los animales (Ramírez et al., 2011).

Cuadro clínico en ovinos y caprinos

Los LvPR causan infecciones persistentes e irreversibles que se reflejan en enfermedades inflamatorias progresivas y degenerativas caracterizadas por periodos de incubación largos, de 1 a 3 años (Figura1). Sólo el 30-35% de los caprinos infectados manifiestan signos clínicos o la enfermedad (Cortes-Romero et al., 2013).

La aparición de lesiones coincide a menudo con infecciones bacterianas secundarias, cambios en la alimentación y situaciones de estrés, incluidas las fisiológicas como la gestación, el parto y la lactación. La frecuencia de las formas clínicas parece variar según la zona geográfica, tropismo de la estirpe viral, la ruta inicial de exposición al virus, la carga genética individual, la edad y la raza del animal (Ramírez, 2010).

Las manifestaciones clínicas ocurren en una tercera parte de los animales infectados, que en orden de frecuencia de presentación en ovinos son, pulmonar, mamaria y en ocasiones nerviosa y articular. En caso de los caprinos las manifestaciones clínicas comunes son la articular, mamaria, pulmonar y raramente la forma nerviosa causando leucoencefalitis en animales jóvenes. Todas las formas clínicas se caracterizan por producir inflamación intersticial no purulenta, generando un incremento de linfocitos en órganos, como pulmón o glándula mamaria (Turchetti et al., 2013 y Blacklaws, 2012).

La infección por los virus tipo ovino se manifiestan de dos formas: la forma respiratoria (Maedi) que comúnmente genera disnea progresiva, hiperpnea y pérdida de peso en ovinos mayores de 3 años de edad. La forma nerviosa (Visna) se expresa rara vez y sus resultados son ataxia, temblores y pérdida de peso (Jubb et al., 2007).

La infección por los virus tipo caprino pueden causar cuatro formas clínicas; artritis en cabras adultas resultando en cojeras crónicas e inflamación de la articulación carpal o tarsal, la forma neurológica que se manifiesta en cabritos de 2-4 meses de edad o en animales viejos, es caracterizada por ataxia progresiva y debilidad en las extremidades posteriores (Jubb et al., 2007). La forma mamaria presenta una mastitis indurativa, no dolorosa, con tumefacción que puede ser detectada mediante palpación. Por último, la forma respiratoria se caracteriza por una neumonía intersticial, generando inflamación en los septos alveolares que ocasiona una deficiencia en el intercambio de oxígeno que deriva en pérdida de peso (Minguijón et al., 2015).

Forma articular

La forma articular se presenta en animales mayores al año de vida, con pérdida progresiva de peso, pelo escaso en la zona de afección, pueden sufrir abscesos, ulceraciones, dermatitis, aumento de volumen considerable de las articulaciones carpianas (Figura 1) y osteomielitis. El tejido periarticular al igual que la capsula sinovial se mineraliza dando como consecuencia el endurecimiento de los miembros, esta afección se presenta de forma bilateral en la mayoría de las ocasiones (Figura 2); esta afección puede alcanzar a ligamentos y tendones y que pueden llegar a osificarse (Pérez et al., 2015). Las articulaciones se tornan rugosas e irregulares y se endurecen (Trigo, 1991). En orden de importancia y frecuencia las articulaciones carpianas son las más afectadas, seguidas de las metatarsianas y las femorotibiorotulianas (Trigo, 1991 y Pérez et al., 2015).

Forma pulmonar

De manera inicial la neumonía intersticial linfocítica multifocal puede afectar animales jóvenes y adultos, es caracterizada por ser una neumonía intersticial con caquexia (Pérez et al., 2015), el signo más característico es la disnea con aumento en la frecuencia respiratoria, respiración abdominal, extensión del cuello y jadeo al progresar la infección (la respiración se vuelve más difícil), pueden presentarse infecciones secundarias por bacterias; en estos casos los animales presentan fiebre y pueden morir debido a la anorexia y las infecciones secundarias. La neumonía intersticial se presenta dañando lóbulos caudales y craneoventrales con inflamación de los bronquios y proliferación de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (Trigo, 1991).

Forma nerviosa

Los signos clínicos generalmente aparecen en 1-2 años de edad, pero se han detectado en animales de tan sólo 4 meses (Ramírez et al., 2012). La forma nerviosa inicia con cojera y ataxia, seguido de debilidad en los miembros, parálisis, opistótonos e hiperestesia; el animal mantiene el apetito posteriormente arquea el cuello, con movimientos en círculo y de pedaleo; la fiebre solo se presenta cuando interviene un agente bacteriano secundario, por lo general el animal muere y si sobrevive presenta secuelas

neurológicas (Trigo, 1991). Se presenta meningoencefalitis, astrocitosis, microgliosis y desmielinización focal secundaria en el cerebro y la médula espinal que conduce a pérdida de masa, ataxia y paresia, por lo general de las extremidades posteriores (Jubb et al., 2007).

Forma mamaria

La forma mamaria produce mastitis intersticial y reduce la producción de leche (Pérez et al., 2015), dicha afección se manifiesta en las cabras seropositivas mayores de 12 meses. La lesión de glándula mamaria se caracteriza histológicamente por la atrofia generalizada glandular, la fibrosis intersticial pronunciada e infiltrados prominentes de linfocitos y macrófagos (Adedeji, 2013), lo que ocasiona un descenso en la producción y en la calidad de la leche hasta del 15% o una agalactia total sin regreso a las condiciones normales (Crawford and Adams, 1981).



Figura 1.- Hembra infectada con AEC, que presenta pelo hirsuto, inflamación de las articulaciones carpales, así como asimetría de glándula mamaria



Figura 2.- Articulación carpal derecha con mineralización de tejidos

Patogenia

El cambio central por la infección de LvPR es la infiltración de tejidos por células mononucleares, ya sea linfocitos, monocitos o células plasmáticas reclutadas de la sangre. Los cuatro principales órganos afectados son el pulmón, sistema nervioso central, glándula mamaria y articulaciones. Sin embargo, las lesiones patológicas también pueden verse en otros órganos como riñón, hígado y corazón (Blacklaws, 2012).

El virus pasa a las células mononucleares en el tejido linfoide subyacente y posteriormente llega a nódulos linfáticos vía linfa. Las células en la zona de infección juegan un papel importante en la transferencia del virus a los tejidos linfoides, viajando por la linfa aferente hasta los nódulos linfáticos correspondientes donde el virus podrá replicarse. Allí acudirán y proliferarán nuevas células del sistema inmune que contribuirán a la linfadenopatía típica y el virus dispondrá de nuevas células permisivas a las que infectar. Así, la diseminación del virus comenzará a través del sistema linfático eferente y del conducto torácico, penetrando en el torrente sanguíneo y distribuyéndose a diferentes órganos (Ramírez, 2010).

En el animal infectado se observa una fase de viremia en la que el antígeno viral se expone al sistema inmune, dando lugar a la síntesis de anticuerpos del hospedador y produciendo la seroconversión, tras la viremia inicial, la infección entra en un estado de latencia que puede durar semanas o meses. En la fase de latencia el virus se replica continuamente, pero en una tasa baja, sobre todo en nódulos linfáticos. El virus retoma el ciclo replicativo y se sintetiza antígeno, que es captado por células presentadoras de antígeno, estas se rodean de linfocitos a los que se presentan los epítomos, dando lugar a focos de inflamación con los infiltrados linfocitarios típicos de las lesiones que se observan en los órganos diana y que conducen a la aparición de signos (Ramírez, 2010).

Las células diana son monocitos/macrófagos junto con células dendríticas, estas células son las encargadas de captar antígenos y presentarlos a los linfocitos para desencadenar una respuesta inmune específica. La infección de este tipo de células puede causar desregulación en la respuesta inmune debido a la ausencia de respuesta de memoria o perpetuando las infecciones (Ramírez, 2010).



Figura 3.- Patogenia de LvPR por transmisión vía calostro o leche

Transmisión

Poco después de que los LvPR infectan una célula, el virus entra en un estado de latencia o de replicación restringida (Haase, 1986). Por lo tanto, la cantidad de virus en la sangre y las secreciones tiende a ser muy bajo, en sangre alrededor de 10^6 - 10^7 células mononucleares están infectadas, sin embargo, a pesar del bajo número de partículas virales, la transmisión puede ocurrir entre madre y cría o entre animales adultos (Blacklaws et al., 2004 y Ramírez, 2010).

La transmisión vertical es la de mayor importancia y se da de madre a cría a través de la ingestión de calostro y/o leche infectada, o por medio de la inhalación de las secreciones respiratorias. Sin embargo, muchos estudios también demuestran que se puede producir infección intrauterina (Sánchez et al., 2016), siendo considerada esta vía de transmisión controversial.

Algunos autores describen que el ambiente intrauterino puede proporcionar un entorno adecuado para que el virus infecte a los fetos. Otros autores han reportado la identificación de los LvPR en animales recién nacidos privados de leche, calostro y del contacto con sus madres (Blacklaws et al., 2004).

Se han detectado LvPR en el semen lo que podría ser una fuente de transmisión (Peterson et al., 2008). Los LvPR pueden encontrarse en órganos sexuales y semen de caprinos y ovinos en tres diferentes formas: como ADN proviral (macrófagos), como virión asociado a células (partículas completas del virus de cadena sencilla de ARN y proteínas liberadas por gemación adheridas en membrana plasmática) y virus libre (liberado por células en lisis) (Cortez-Romero et al., 2013).

Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por LvPR puede ser realizado de forma clínica con aquellos animales que presentan signos, no obstante, como el número es bajo es más conveniente realizar pruebas serológicas o de biología molecular. Las infecciones se diagnostican ya sea mediante técnicas indirectas, que detectan anticuerpos, o por técnicas directas que detectan el virus en sí (Barquero et al., 2013). La técnica de biología molecular de Reacción en Cadena

de la Polimerasa (PCR) comúnmente se aplica para el diagnóstico *in vitro* de LvPR. Sin embargo, los métodos indirectos son los más usados para la detección de la infección, tales como el diagnóstico serológico que se emplea para detectar anticuerpos contra LvPR. La producción de anticuerpos es detectada por las técnicas de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA), Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA), Radioinmunoprecipitación (RIPA) y Western Blot (WB) (de Andrés et al., 2005). IDGA es altamente específica, pero de baja sensibilidad y a menudo relacionada con una interpretación subjetiva, la prueba de ELISA es de bajo costo y de fácil aplicación e interpretación. En la actualidad no se ha desarrollado una “prueba de oro” para el diagnóstico de LvPR, y la utilización conjunta de técnicas directas e indirectas, se indica para el diagnóstico precoz (Ramírez et al., 2013, Barquero et al., 2013, de Andrés et al., 2005, Reina et al., 2009)

Características generales de los lentivirus

Clasificación taxonómica de los LvPR.

Familia	Género	Especies
<i>Retroviridae</i>	<i>Alpharetrovirus</i>	
	<i>Betaretrovirus</i>	
	<i>Gammaretrovirus</i>	
	<i>Deltaretrovirus</i>	
	<i>Épsilonretrovirus</i>	
	<i>Spumavirus</i>	
	<i>Lentivirus</i>	Virus de inmunodeficiencia humana, (VIH) Virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS) Virus maedi visna (VMV) Virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) Virus de anemia infecciosa equina (VAIE) Virus de inmunodeficiencia felina (VIF) Virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB) Lentivirus del puma

Los retrovirus se caracterizan por transcribir su ARN sencillo a ADN de doble cadena (dsDNA) a través de la acción de la enzima Transcriptasa Reversa (RT). El virión de los LvPR tiene un diámetro de 80-100 nm y están compuestos por una nucleocápside (NC), cápside (CA), matriz (MA) y envoltura (ENV). Dentro de la nucleocápside se encuentra el genoma, el cual incluye cerca de 30 moléculas de transcriptasa reversa y las enzimas proteasa e integrasa. La cápside de morfología icosaédrica de 60 nm de diámetro es rodeada por la proteína de matriz. El virión presenta una envoltura externa formada por una bicapa lipídica que contiene la proteína transmembranal (TM) y la de superficie (SU) que se originan de la célula del hospedero como se muestra en la figura 4 (Minguijón et al., 2015).

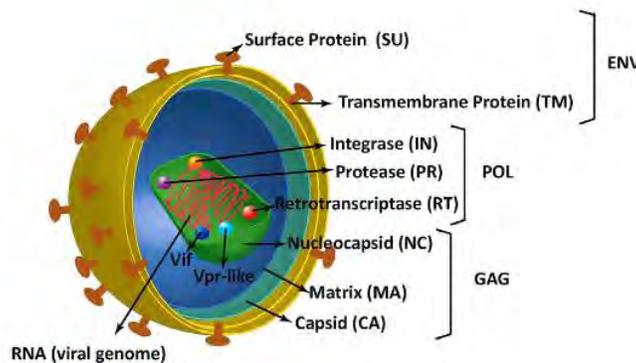


Figura 4.- Estructura de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (Minguijón et al., 2013).

Los lentivirus están compuestos aproximadamente por 60% de proteínas, 35% lípidos, 3% carbohidratos y 1% ARN (Minguijón et al., 2013). Estos virus contienen información genética básica, el genoma del provirus presenta regiones terminales repetidas no codificantes (LTR) en los extremos, que se dividen en las regiones U3, R y U5 (Stonos et al., 2014). Estas regiones proporcionan las señales necesarias para la transcripción viral y la integración en el genoma del huésped. Entre los LTRs se encuentran tres genes estructurales: el gen *gag* que codifica proteínas de nucleocápside, cápside y matriz, el gen *pol* que codifica la transcriptasa reversa, proteasa e integrasa y el gen *env* que se encarga de codificar la proteína transmembranal (gp38) y glicoproteínas de superficie (gp135). Cuenta con tres

genes accesorios, el gen *vpr-like* es imprescindible para la replicación viral, el gen *vif* que es necesario para una eficiente replicación del virus *in vivo* y en la patogenicidad y el gen *rev* que es responsable en la replicación y empaquetamiento del genoma viral (Stonos et al., 2014 y Minguijón et al., 2015). En la figura 5 se muestra el mapa genómico de los LvPR (Stonos et al., 2014).

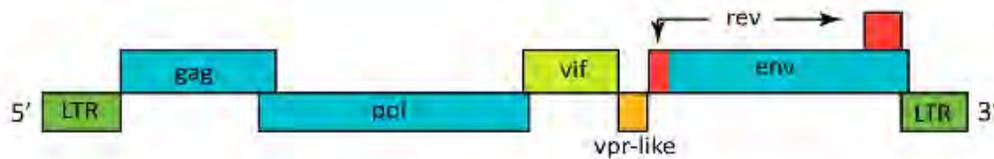


Figura 5.- Mapa genómico de LvPR (Minguijón et al., 2013).

Replicación

El virus entra a la célula hospedadora, infecta monocitos, macrófagos y células tipo fibroblásticas, mediante fusión de la envoltura viral con la membrana celular, mediada por el ligando del virus que es la gp135 (Ramírez, 2010) la cual se une a los receptores celulares, se han propuesto diferentes moléculas capaces de cumplir la función de receptores como el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II o receptores de manosa, sin embargo, estos receptores no se han establecido como los principales (Ramírez, 2010). Las membranas vírica y celular se fusionan por la acción de la proteína transmembranal (Lazcano, 2013). Tras esta fase de adsorción y penetración la nucleocápside queda libre en el citoplasma en un proceso denominado desnudación, las enzimas víricas se asocian al ARN del huésped, esta fase constituye un periodo de latencia que se mantiene hasta que un estímulo externo activa la expresión y replicación viral. Una vez que el virus entra en el citoplasma celular y queda liberado de su envoltura, comienza la retrotranscripción (Ramírez, 2010). La retrotranscripción del ARN viral culmina con la generación de una doble cadena de ADN. Al finalizar la síntesis de la doble cadena de ADN es transportado al núcleo de la célula (Lazcano, 2013), en donde el ADN lineal es integrado al ADN del hospedero con ayuda de la integrasa viral. Una vez integrado en el monocito la replicación del virus comienza hasta que maduren a macrófagos. La fase de transcripción genética origina ARN el cual es utilizado

como genoma del nuevo virión y ARNm para las poliproteínas. Las proteínas de Gag y Pol se asocian con el ARN viral formando un núcleo “core” intracelular, las proteínas de Env se insertan en la membrana plasmática de la célula para su posterior salida de la célula por gemación, durante la cual el virus adquiere una doble capa lipídica en su superficie (Aguilar 2009).

Tropismo

Los VAEC y VMV son transportados por los monocitos a distintos tejidos, estas células son permisivas para la entrada viral y la integración del genoma (provirus), pero la infección permanece latente hasta que se diferencia en macrófagos (Ramírez et al., 2013; Blacklaws, 2012); pero la replicación del virus en estas células *in vivo* se restringe de manera que sólo se producen pequeñas cantidades de virus. Un factor que restringe la replicación del virus es la madurez de las células (Gendelman et al., 1986). Los LvPR pueden replicarse en macrófagos maduros o tejidos relacionados a los monocitos circulantes, actuando estos últimos como un "Caballo de Troya" (Ramírez et al., 2013). Las células monocíticas con provirus de LvPR están presentes en las lesiones, pero también se pueden encontrar en tejidos no infectados (Lechat et al., 2005). Los monocitos/macrófagos son considerados las principales células diana del virus, sin embargo, otras células pueden ser infectadas como son células de la microglía, astrocitos y oligodendrocitos, así como neumocitos tipo I y II, fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales (Lechat et al., 2005).

Se han descrito algunos tipos celulares que pueden infectarse tanto *in vivo* como *in vitro* como se observa en el cuadro 2 (Ramírez, 2010). Los macrófagos se utilizan de forma rutinaria para el aislamiento del virus debido a su alta tasa de replicación viral, así como, las células de la membrana sinovial fibro-epitelial y células del plexo coroideo derivadas de caprinos u ovinos (Ramírez et al., 2013).

Cuadro 2.- Tropismo celular in vitro del virus de la leucemia murina (MuLV) pseudotipado con Env de VAEC y VMV

	Origen	Tipo	Entrada de MuLV pseudotipados con Env de	
			VMV	VAEC
Plexo coroideo	Ovino	Epitelial	+	+
Membrana sinovial	Caprino	Fibroblasto	+	+
MDBK	Bovino	Epitelial	+	+
HeLa	Humano	Epitelial	+	-
U87MG	Humano	Epitelial	+	-
293T	Humano	Epitelial	+	+
TE671	Humano	Epitelial	NE	-
A431	Humano	Epitelial	-	-
THP-1	Humano	Monocítica	+	-
U937	Humano	Monocítica	-	-
EK	Equino	Epitelial	+	-
Vero	Mono	Epitelial	+	-
NIH 3T3	Murino	Fibroblasto	-	-
CHO-K1	Hamster	Fibroepitelial	-	NE
Ibmec	Humano	Endotelial	+	NE
CEM	Humano	Linfoblastos-T	+	NE
CEMx174	Humano	Linfoblastos	+	NE
Jurkat	Humano	Linfocítica	+	NE
BHK-21	Hamster	Fibroblasto	+	NE
RAW264.2	Murino	Monocítica	+	NE
COS-7	Mono	Fibroblasto	+	NE
QT6	Ave	Fibroblasto	+	NE

NE= no evaluado

Ramírez, 2010

El tropismo de los LvPR está vinculado a la genética del hospedero y al genoma viral (Cuadro3): hospedador (caprinos y ovinos), tejidos de acuerdo a la forma de la enfermedad (mastitis, artritis, encefalitis o neumonía) y el tipo de célula. Originalmente se estableció el virus de AEC y MV como patógenos específicos en caprinos y ovinos, respectivamente, sin embargo, estudios recientes han demostrado que cruzan la barrera específica, infectando a sus nuevos hospedadores. Pueden clasificarse en cepas rápidas/altas o lentas/bajas. Las cepas rápidas se replican rápidamente, induciendo la formación de sincitios, la lisis celular, y alcanzando altos títulos. Las cepas lentas crecen lentamente y con un título bajo. Los aislados de ovinos pertenecen al primer tipo; mientras que los aislados de cabras muestran un fenotipo lento (Ramírez et al., 2013).

Cuadro 3.- Principales células blanco descritas para el género lentivirus

Virus	Especie infectada	Célula blanco	Manifestación clínica
VAIE	Equinos	Monocitos/macrófagos	Infección cíclica en el primer año, anemia hemolítica y encefalopatías.
VMV/VAEC	Ovinos/caprinos	Monocitos/macrófagos y células dendríticas	Neumonía intersticial, encefalitis, mastitis y artritis.
VIB	Bovinos	Macrófagos	Linfadenopatía e inmunodeficiencia
VIF	Felinos	Linfocitos T, linfocitos B, monocitos/macrófagos	Inmunodeficiencia, presencia de tumores e infección oportunista

VIS	Primates	Linfocitos T, monocitos/ macrófagos	Immunodeficiencia, encefalopatía e infección oportunista
VIH	Humano	Linfocitos T, monocitos/ macrófagos	Immunodeficiencia, encefalopatía, mielopatía e infección oportunista

Rodríguez, 2008

Justificación

Por la importancia que tienen los machos en aspectos reproductivos en los rebaños de pequeños rumiantes, es relevante monitorear el estado de la salud de los mismos y dado que el macho es utilizado para la monta de un gran número de hembras se incrementa el riesgo de transmisión de enfermedades venéreas, entre ellas las relacionadas con la infección por LvPR. Aunque se ha descrito la presencia de estos virus en semen o en algunas células de tracto reproductor, existe escasa información sobre la susceptibilidad a la infección de células epiteliales del prepucio, en especial en los ovinos, por lo que resulta importante valorar la presencia de provirus en células epiteliales para corroborar la posible susceptibilidad de estas, las cuales pueden estar involucradas en la transmisión vía sexual.

Hipótesis

Si es factible amplificar una región genómica de LvPR de machos caprinos y/u ovinos a partir de leucocitos de sangre periférica y células epiteliales de prepucio utilizando la técnica de PCR, entonces, es posible establecer que la infección por LvPR está sucediendo a nivel local y sistémico.

Objetivo general.

Determinar la susceptibilidad de células del epitelio prepucial y leucocitos de sangre periférica a la infección por Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) mediante el uso de la prueba de PCR, en ovinos y caprinos infectados naturalmente.

Objetivos específicos.

1. Identificar mediante el uso de pruebas serológicas ovinos y caprinos infectados con LvPR.
2. Colectar muestras de lavados prepuciales y sangre periférica completa de ovinos y caprinos, y separar las células epiteliales de los lavados prepuciales y los leucocitos de sangre.
3. Estandarizar la técnica de PCR para detectar una región genómica del provirus de LvPR a partir del ADN genómico total obtenido de las células mononucleares.

Material y métodos.

Animales de estudio.

El grupo de estudio se conformó por 19 sementales ovinos (n=10) y caprinos (n=9) pertenecientes a rebaños destinados a la producción láctea y una explotación destinada a la producción de carne, cumpliendo las características que se muestran en el cuadro 4

Cuadro 4.- Características de los animales de estudio

Especie	Cantidad	Región	Raza	Edad
Ovinos	10	Estado de México	Awassi Friesian Columbia	2-4 años
Caprinos	09	Estado de México y Guanajuato	Saanen, Alpina Francesa y Toggenburg	8 meses - 4 años

Colección de muestras sanguíneas.

Se colectaron 10 ml de sangre por punción de la vena yugular, utilizando tubos estériles con anticoagulante (Heparina). En el laboratorio la sangre se centrifugó a 250g durante 10 minutos para separar los leucocitos de sangre periférica (LSP) y el plasma (Ver apéndice 1), este último se utilizó para determinar la presencia de anticuerpos contra la infección por LvPR en los animales utilizando pruebas de ELISA comerciales y ELISAs basadas en el uso de péptidos sintéticos (Aguilar, 2015). Los LSP fueron usados para la detección de ADN proviral mediante PCR.

Obtención de células epiteliales del prepucio.

Para la obtención de células epiteliales de prepucio (CEP) se realizaron lavados genitales, realizando sujeción sin tranquilizante, se realizó una limpieza y asepsia de la zona prepucial para posteriormente introducir 10 ml de solución de Hank's estéril con un pH de 7.2 y antibiótico en el orificio prepucial, para ello se utilizó una pipeta estéril de 10 cm de largo, se dejó la solución por un periodo de un minuto aplicando masaje en la zona y posteriormente se recuperó en tubos cónicos de 15 ml estériles. Las muestras fueron transportadas al laboratorio manteniéndolas en refrigeración y fueron centrifugadas a 250g durante 5 minutos para separar el paquete celular, parte del paquete celular se utilizó para realizar frotis y tinción de Papanicolaou, el resto de las células se almacenaron a -20°C hasta su uso en la extracción de ADN.

Tinción de Papanicolaou.

Se realizaron frotis y se utilizó la tinción de Papanicolaou para la identificación, diferenciación y cuantificación de las células obtenidas (Ver apéndice2).

Serología.

El plasma obtenido se utilizó para determinar el estado serológico a la infección por LvPR en los animales de estudio, utilizando pruebas comerciales de ELISA tipo competitivo (VMRD) e indirecto (ELITEST). Se ha determinado que el ELISA competitivo para la detección de anticuerpos séricos contra VAEC en caprinos ha demostrado tener una especificidad del 96.4% y una sensibilidad del 100% (Herrmann et. al., 2003). Por otro lado, el ELITEST que es de tipo indirecto, ha demostrado tener una sensibilidad del 99.4% y una especificidad del 99.3% en la detección de anticuerpos contra VAEC y VMV (Saman et. al., 1999). El desarrollo de las técnicas se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (Ver apéndice 3 y 4). Adicionalmente se utilizaron ELISAs experimentales (basadas en el uso de péptidos sintéticos). 126 M1 (Especificidad del 95% y sensibilidad del 82%) y 126 M2 (Especificidad del 88% y sensibilidad del 68%) detectan principalmente a genotipos tipo VAEC (péptido-genotipo B) y genotipos tipo VMV (péptido genotipo A) respectivamente (de Andrés et. al., 2013), estandarizados previamente por Aguilar, 2015 (Ver apéndice 5).

Extracción de ADN.

Para extraer el ADN de las células epiteliales y de los LSP se utilizó un kit comercial (Favorprep) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver apéndice 6).

PCR.

Para la detección del ADN proviral en LSP y CEP se estandarizó la PCR semianidada punto final utilizando iniciadores que amplificaban un fragmento del gen *env* del genoma de los LvPR. Denominados: Ces ENV1 FW 5'TGGAATTGTTACAGAATTGGA3', Ces ENV2 FW 5'GGGAACTAACACAAATTGGAC3', Ces ENV RV 5'TGCCAGCAATCCAATTCTT3'. La mezcla de reacción para las dos rondas de PCR fueron: buffer 1X, 2mM de MgCl₂, 224 μM de dNTPs, 600nM de cada primer, 0.08U/μl de Taq ADN polimerasa y 1000 ng de ADN para la primer ronda de PCR y 5 μl del producto de la primer PCR para la segunda ronda, en un volumen final de 30 μl. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial por 5 minutos a 95° C, seguido por 45 ciclos a 95° C por 40 segundos, alineamiento 52° C por 40 segundos en la primer ronda de PCR y de 53° C por 40 segundos para la segunda ronda, y extensión a 72°C por 60 segundos y un paso final de extensión a 72°C por 7 minutos. El tamaño de amplificación positivo esperado fue de 587 pb (pares de bases), los cuales fueron separados por electroforesis, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador.

Resultados

Serología.

La cantidad de animales que resultaron seropositivos en las diferentes pruebas serológicas utilizadas, tanto de tipo comercial (ELITEST y VMRD), así como en los ELISAs experimentales (péptidos sintéticos) se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5.- Detección de anticuerpos contra lentivirus de pequeños rumiantes por especie en 2 ELISAs comerciales y 2 ELISAs con péptido sintético como antígeno.

Especie	VMRD	ELITEST	126 M1	126 M2
Ovino	4/10	1/10	0/10	1/10
Caprino	3/9	3/9	3/9	3/9

VMRD= antígenos del genotipo B; ELITEST= antígenos del genotipo A; 126m1, ELISA indirecta péptido-genotipo B; 126m2, ELISA indirecta péptido-genotipo A.

La técnica de VMRD comercial detectó un mayor número de ovinos positivos (n=4) a la infección por LvPR, en el caso de los caprinos 3 de ellos fueron identificados como positivos tanto en las pruebas comerciales como en las de los péptidos sintéticos.

Los resultados positivos y negativos obtenidos en las 4 pruebas serológicas para identificar anticuerpos contra LvPR en ovinos se muestran en el cuadro 6, es importante mencionar que sólo un ovino resulto positivo en tres de las cuatro pruebas serológicas utilizadas.

Cuadro 6.- Serología positiva y negativa a lentivirus de pequeños rumiantes de ovinos en diferentes pruebas de ELISA.

Muestra	VMRD	ELITEST	126 M1	126M2
129	NEG	NEG	NEG	NEG
251	POS	NEG	NEG	NEG
281	POS	NEG	NEG	NEG
350	NEG	NEG	NEG	NEG
533	NEG	NEG	NEG	NEG
643	POS	POS	NEG	POS
729	NEG	NEG	NEG	NEG
3962	POS	NEG	NEG	NEG
6042	NEG	NEG	NEG	NEG
8077	NEG	NEG	NEG	NEG

VMRD= antígenos del genotipo B; ELITEST= antígenos del genotipo A; 126m1, ELISA indirecta péptido-genotipo B; 126m2, ELISA indirecta péptido-genotipo A.

Los resultados positivos y negativos obtenidos en las 4 pruebas serológicas para identificar anticuerpos contra LvPR en caprinos se muestran en el cuadro 7, es importante resaltar que los caprinos con resultado positivo, lo fueron en todas las pruebas serológicas utilizadas.

Cuadro 7.- Serología positiva y negativa a lentivirus de pequeños rumiantes de caprinos en diferentes pruebas de ELISA.

Muestra	VMRD	ELITEST	126 M1	126M2
8859	NEG	NEG	NEG	NEG
8860	NEG	NEG	NEG	NEG
8866	NEG	NEG	NEG	NEG
704413	NEG	NEG	NEG	NEG
595	NEG	NEG	NEG	NEG
195	NEG	NEG	NEG	NEG
831	POS	POS	POS	POS
175	POS	POS	POS	POS
X1	POS	POS	POS	POS

VMRD= antígenos del genotipo B; ELITEST= antígenos del genotipo A; 126m1, ELISA indirecta péptido-genotipo B; 126m2, ELISA indirecta péptido-genotipo A.

Células prepuciales.

Con la tinción realizada se distinguieron diferentes tipos celulares presentes en los frotis, células parabasales, intermedias, escamosas y polimorfonucleares (Figura 6), se realizó una cuantificación por campo de observación de las células obtenidas (cuadro 8).

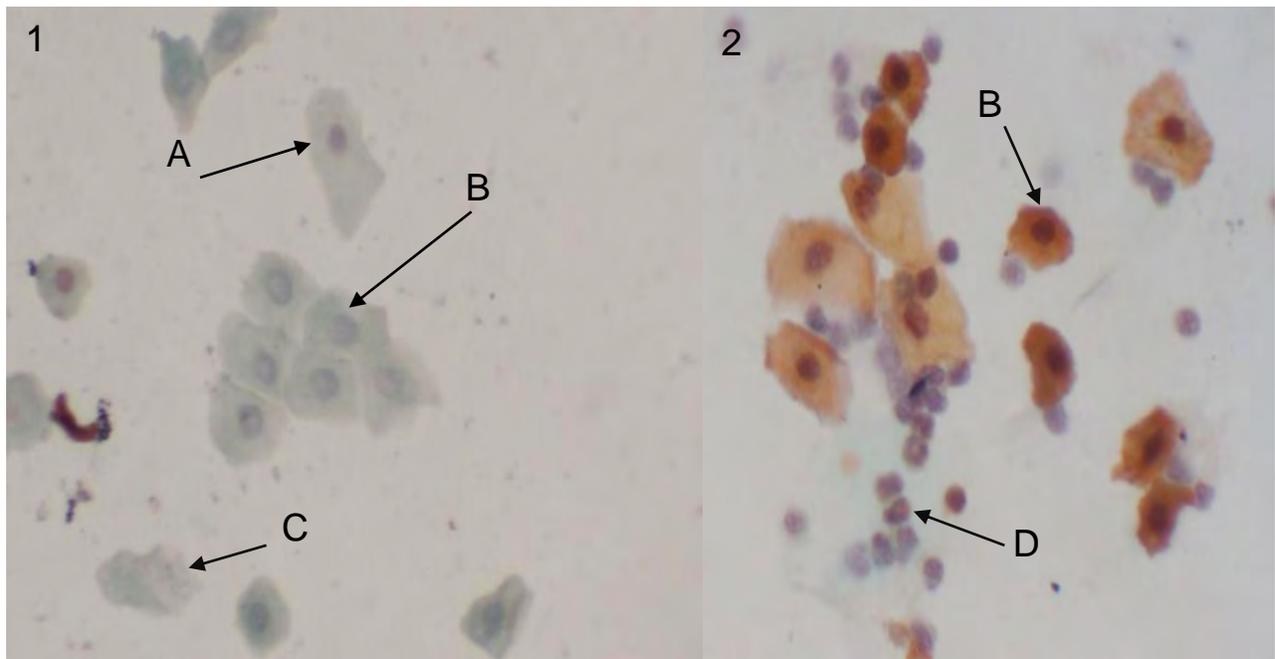


Figura 6.- Se muestran citologías exfoliativas de células epiteliales de prepucio teñidas mediante la técnica de Papanicolaou. **40X**. A: células intermedias; B: células parabasales; C: células escamosas y D: polimorfonucleares.

Cuadro 8.- Cantidad de células epiteliales prepuciales de ovinos y caprinos observadas con la tinción de Papanicolaou.

Espece	Muestra	Celularidad
Ovino	129	++
Ovino	251	+
Ovino	281	+
Ovino	350	+++
Ovino	533	+++
Ovino	643	++
Ovino	712	+++
Ovino	729	+
Ovino	3962	++
Ovino	6042	+++
Ovino	8077	+++
Caprino	8859	++
Caprino	8860	+++
Caprino	8866	++
Caprino	704413	+
Caprino	595	+++
Caprino	195	+
Caprino	831	+
Caprino	175	++
Caprino	X1	---

+++ abundante; ++ moderado; + escaso; --- nulo.

En general se observaron células propias del epitelio prepucial en una proporción de moderada a abundante en los frotis celulares. Mostrando células nucleadas lo que indicó la factibilidad de extraer ADN.

PCR

Se observaron resultados positivos con la técnica de PCR logrando un producto de amplificación de 587 pb, lo que indicó la presencia de ADN proviral de LvPR tanto en LSP y CEP de los ovinos y caprinos. Identificando 2 caprinos y 6 ovinos positivos a partir de leucocitos de sangre periférica, 4 ovinos y 5 caprinos positivos en células epiteliales de prepucio (Cuadro 9).

Cuadro 9.- Resultados obtenidos en leucocitos de sangre periférica y células epiteliales de prepucio con la técnica de PCR semianidada que amplifica una región del gen *env* de LvPR.

Especie	Muestra	PCR <i>env</i>	
		LSP	CEP
OVINO	129	NEG	NEG
OVINO	251	POS	NEG
OVINO	281	POS	POS
OVINO	350	POS	NEG
OVINO	533	NEG	NEG
OVINO	643	NEG	POS
OVINO	729	POS	NEG
OVINO	3962	NEG	POS
OVINO	6042	POS	POS
OVINO	8077	POS	NEG
CAPRINO	8859	NEG	POS
CAPRINO	8860	POS	POS
CAPRINO	8866	NEG	POS
CAPRINO	704413	POS	NEG
CAPRINO	595	NEG	NEG
CAPRINO	195	NEG	POS
CAPRINO	831	NEG	NEG
CAPRINO	175	NEG	POS
CAPRINO	X1	NEG	NEG

PCR *env*= PCR que amplifica una región del gen *env*; LSP= leucocitos de sangre periférica; CEP= células epiteliales de prepucio.

Cuadro 10.- Resultados obtenidos en la detección de respuesta a lentivirus de pequeños rumiantes en ovinos y caprinos utilizando pruebas serológicas y de PCR.

Especie	Muestra	Serología	PCR <i>env</i>	
			LSP	CE
OVINO	129	NEG	NEG	NEG
OVINO	251	POS	POS	NEG
OVINO	281	POS	POS	POS
OVINO	350	NEG	POS	NEG
OVINO	533	NEG	NEG	NEG
OVINO	643	POS	NEG	POS
OVINO	729	NEG	POS	NEG
OVINO	3962	POS	NEG	POS
OVINO	6042	NEG	POS	POS
OVINO	8077	NEG	POS	NEG
CAPRINO	8859	NEG	NEG	POS
CAPRINO	8860	NEG	POS	POS
CAPRINO	8866	NEG	NEG	POS
CAPRINO	704413	NEG	POS	NEG
CAPRINO	595	NEG	NEG	NEG
CAPRINO	195	NEG	NEG	POS
CAPRINO	831	POS	NEG	NEG
CAPRINO	175	POS	NEG	POS
CAPRINO	X1	POS	NEG	NEG

En el caso de los ovinos se observan 8 animales positivos a PCR en al menos un tipo celular, siendo la muestra 281 positiva tanto en serología como en PCR de CEP y LSP, la muestra 643 y 3962 se mostraron positivas en serología y CEP únicamente. Para los caprinos se encontraron 6 animales positivos en PCR en al menos un tipo celular, la muestra 175 resulto positiva en serología y CE como se observa en el cuadro 10.

En general, el 47% (n=9) de los animales resultaron positivos por PCR en células epiteliales de prepucio, encontrando correlación de positividad en los LSP y CEP en 3 animales, 2 ovinos y un caprino, y solo un ovino resulto positivo tanto en la detección de anticuerpos y ADN proviral en ambos tipos celulares.

Separación de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa:

En la figura 7 se muestran los amplificados del LvPR a partir del ADN de células epiteliales de prepucio (CEP) y leucocitos de sangre periférica (LSP) de machos ovinos y caprinos, observando un producto de amplificación de 587 pb.

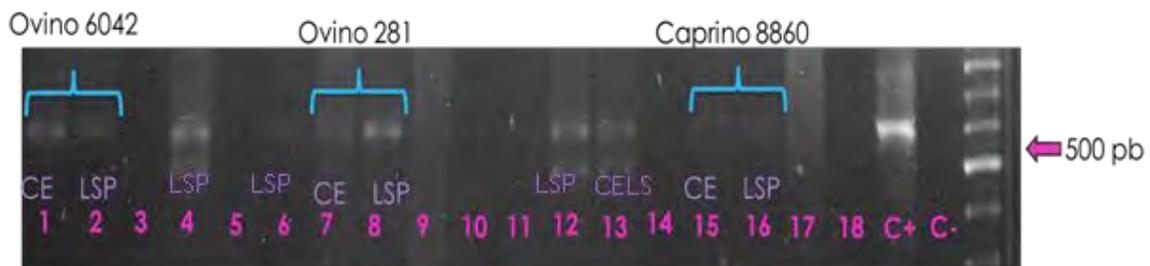


Figura 7.- Resultados obtenidos por PCR en muestras de ADN de células epiteliales y leucocitos de ovinos y caprinos. Los amplicones positivos a LvPR en ambas células del mismo animal se encuentran marcados por corchetes. Separación electroforética en agarosa al 1.5%.

C+: control positivo; C-: control negativo. En los carriles 1,2,4,6,7,8,12,13,15 y 16 se observan productos de amplificación positivos a LvPR mediante PCR.

Discusión

Se han realizado diversos estudios acerca de las diferentes vías de transmisión de Lentivirus de Pequeños Rumiantes, los que incluyen en orden de importancia la transmisión por el uso de calostro, leche y algunos otros fluidos biológicos (Por ejemplo, saliva, secreción vaginal o semen) que pasan por contacto directo y la presencia de virus en aerosoles (Preziuso et al., 2004, Peterhans et al., 2004, Blacklaws, 2004, Leginagoikoa et al., 2009). Por otro lado, en la vía de transmisión sexual que vincula a las hembras se ha demostrado la presencia de ADN proviral en tejido genital: útero, oviducto y ovario (Ali-Al-Ahmad et al., 2012, Cortez-Romero et al., 2004, Cortez-Romero et al., 2013). También se ha demostrado la transmisión intrauterina en ovinos de la raza pelibuey (Sánchez et al., 2016, Álvarez et al., 2005). No obstante, los trabajos que se enfocan en los machos como posibles transmisores de LvPR no son muy abundantes y con resultados contrastantes entre ellos. En machos se ha detectado ADN proviral y ARN viral en tracto reproductor (células de glándula bulbo uretral, testículo, epidídimo, conductos deferentes y vesícula seminal), líquido seminal y células no espermáticas del eyaculado (Peterson et al., 2008 y Martínez et al., 2005). Además, algunos estudios sugieren que las lesiones inflamatorias en tracto reproductor de macho (como las relacionadas por la infección de *B. ovis*) predisponen a la infección por LvPR a través del semen (de la Concha et al., 1996). Sin embargo, Reina et al., (2011) sugieren que el semen infectado con LvPR puede usarse en inseminación artificial sin el riesgo de transmitirse, no obstante, en un trabajo realizado por de Souza et al., 2013, identificaron que es posible que el virus pueda transmitirse a hembras a través de inseminación artificial con semen proveniente de caprinos infectados. En el presente trabajo se demostró que las células epiteliales del prepucio de ovinos y caprinos pueden infectarse con LvPR y por consiguiente ser un factor adicional a otras fuentes de transmisión vía sexual ya previamente demostradas y en especial por la monta directa de los machos, lo cual sigue siendo un manejo reproductivo frecuente. El prepucio es una capa tegumentaria modificada y envuelve el cuerpo del pene (Eurell et al., 2006), presenta una descamación normal de células epiteliales dentro de las cuales se pueden encontrar células basales, parabasales, intermedias y superficiales. En el presente trabajo se identificaron estos grupos celulares y se pudo coleccionar una cantidad significativa de las mismas, lo que favoreció la extracción de ADN para las pruebas de PCR.

Como lo corroboran estudios en otros retrovirus, como en el caso del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) las células del epitelio vaginal y la trans migración de los macrófagos infectados es un factor importante para transmitir el virus a través de las mucosas mediante relaciones sexuales (Donaghy, 2006). Adicionalmente, se ha propuesto que las células epiteliales pueden ser la fuente de infección al tejido linfocitario (Chou, 2000). En un trabajo previo se demostró *in vitro* la presencia de lentivirus caprino en células epiteliales de prepucio mediante las técnicas de PCR e inmunocitoquímica (Rodríguez, 2008). En el presente estudio se corroboró la infección en CEP de caprinos y además, se demostró por primera vez la infección de CEP de ovinos por LvPR.

Las pruebas de ELISA comerciales han sido diseñadas considerando el uso de antígenos con lisados de virus completos, proteínas recombinantes y la combinación de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, por lo que al utilizar una prueba con un genotipo/antígeno no prevalente en los animales infectados, disminuye la detección de animales positivos, pudiendo ser la razón por la cual existieron diferencias en la detección de anticuerpos entre las pruebas de ELISA utilizadas en el estudio, aunque trabajos donde utilizan estos ELISA's comerciales han descrito altos valores de sensibilidad y especificidad. Cabe resaltar que hasta el momento se han identificado al menos 23 subtipos genéticos de LvPR que infectan a los pequeños rumiantes (Ramírez et al., 2013). Otros estudios han demostrado que el uso combinado de técnicas serológicas y moleculares (Barquero et al., 2013) favorecen la detección de la infección por LvPR. En el presente estudio las técnicas serológicas detectaron un número menor de animales infectados; resultando más sensible la técnica de PCR la cual detectó 14 animales infectados en al menos un tipo celular (LSP y/o CEP). Esto podría estar relacionado a una infección localizada a nivel de aparato reproductor, lo cual no estaría generando una respuesta inmunológica generalizada, explicando así la falta de detección de anticuerpos en plasma sanguíneo. Para demostrar que la replicación viral está estimulando la respuesta inmune local sería adecuado determinar la presencia de anticuerpos en el líquido seminal por pruebas de ELISA como se ha descrito en trabajos anteriores (Ramírez et al., 2009). No obstante, en el presente trabajo no se realizó esta determinación por que no se colectaron muestras de semen.

En los diferentes estudios donde ha utilizado la técnica de PCR para la identificación de ADN proviral de LvPR, ha demostrado ser una técnica adecuada independientemente del tipo celular evaluado. También ha sido frecuente el uso de iniciadores que amplifican diversas regiones genéticas de LvPR. Travassos et al., (1999) identificaron la presencia de lentivirus caprino en plasma seminal utilizando PCR anidada, identificando amplificación de fragmentos de los genes *gag* y *pol*. Resultados similares fueron obtenidos por Ali Al Ahmad et al., (2008). Otro estudio que identificó la presencia de lentivirus caprinos en líquido seminal por PCR utilizando iniciadores para el gen *gag* fue el realizado por Peterson et al., (2008). En el presente estudio se realizó una técnica de PCR semianidada utilizando iniciadores que amplificaban un fragmento del gen *env* (Travassos et al., 1999), con buenos resultados como los descritos para otras regiones genéticas de LvPR.

Conclusiones

Se identificó mediante PCR la presencia de ADN proviral de LvPR en células epiteliales del prepucio de ovinos y caprinos infectados naturalmente identificados por serología.

El uso de la técnica de lavado prepucial es un buen método para la obtención de células destinadas a evaluación con técnicas moleculares.

Se demostró la susceptibilidad de infectarse por LvPR de las células epiteliales del prepucio poniendo de manifiesto que estas pueden participar en la transmisión venérea.

Bibliografía

1. Adams S. et al. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet Rec.* 115 (1984) 493-5.
2. Adams S, et al. Serological evidence of caprine arthritis encephalitis infection in eleven of fourteen contriested. *Vet. Rec.* 115 (1984) 493-495.
3. Adedeji AO et al. A polytropic caprine arthritis encephalitis virus promoter isolated from multiple tissues from a sheep with multisystemic lentivirus-associated inflammatory disease. *Viruses* (2013)
4. Aguilar M. 2015. Uso de péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos específicos contra lentivirus de pequeños rumiantes(LvPR) en leche de rebaños ovinos y caprinos. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México 2015.
5. Ali Al Ahmad M.Z, et al. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology* 69 (2008) 473–480.
6. Álvarez L. Seroprevalencia de la artritis encefalitis caprina en algunos estados de la república. UNAM. 1984.Álvarez, J. et al. Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. *V.* 2005.
7. Barquero N, et al. Evolution of Specific Antibodies and Proviral DNA in Milk of Small Ruminants Infected by Small Ruminant Lentivirus. *Viruses* 5 (2013) 2614-2623.
8. Blacklaws B.A, et al. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 101 (2004) 199–208.
9. Blacklaws B.A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35 (2012) 259– 269

10. Cortez-Romero C, et al. The risk of small ruminant lentivirus (SRLV) transmission with reproductive biotechnologies: State-of-the-art review. *Theriogenology* 79 (2013) 1–9.
11. Crawford T.B. and Adams P.S. Caprine Arthritis Encephalitis: Clinical Features and Presence of Antibody in selected goat populations. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 178 (1981) 713-719.
12. de Andrés X. et al. An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 152(2013) 277-88
13. De Andrés D, et al. Diagnostic test for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology.* 107 (2005) 49-62.
14. de la Concha- Bermejillo A, et al. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *AJVR* 57 (1996) 684-688.
15. de Souza K.C, et al. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination *Small Ruminant Research* 109 (2013) 193– 198.
16. Donaghy H, et al. HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow? Centre for Virus Research, Westmead Millennium Institute and University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia.
17. Eurell J, et al. *Dellmann’s textbook of veterinary histology.* sexta edición 2006 USA.
18. Frías M, et al. phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in mixed flocks: multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 AND b1 between sheep and goats. *Infection, genetics and evolution* 19 (2013) 97-104
19. GENDELMAN E. Tropism of Sheep Lentiviruses for Monocytes: Susceptibility to Infection and Virus Gene Expression Increase during Maturation of Monocytes to Macrophages. *JOURNAL OF VIROLOGY* (1986):67-74
20. Herrmann L. et al. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10 (2003) 267-71.
21. Lazcano R.M.A. Detección de anticuerpos en sementales caprinos y ovinos a lentivirus de pequeños rumiantes, en 7 estados del país. Tesis de licenciatura.

- Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México 2013.
22. Lechat E. et al. Goat endothelial cells may be infected in vitro by transmigration of caprine arthritis-encephalitis virus-infected leucocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104 (2005) 257–263
 23. Leginagoikoa I et al. Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *J Virol Methods* 156 (2009):145-149
 24. Martínez RHA, et al. Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. *Vet Méx* 36 (2005) 159-76.
 25. Minguijón E. et al. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology* 181(2015):75-89
 26. **Nazara S.** et al. *Estudio Clínico – Patológico de la Artritis Encefalitis Caprina en México.* *Vet. Méx*, 16 (1985): 91- 100
 27. Pérez M. Small Ruminant Lentivirus–Induced Arthritis: Clinicopathologic Findings in Sheep Infected by a Highly Replicative SRLV B2 Genotype. *Veterinary Pathology* 52 (2015): 132-139
 28. Peterhans E, et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res* 35 (2004):257-74.
 29. Peterson K, et al. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 69 (2008) 433–442.
 30. Preziuso S, et al. Colostral transmission of maedi visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Veterinary Microbiology* 104 (2004) 157–164.
 31. Ramírez H, et al. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology* 72 (2009) 1085–1096.
 32. Ramírez H. Contribución al diagnóstico y a la filogenia de los lentivirus de pequeños rumiantes. Tesis de Doctorado. Universidad pública de navarra departamento de producción agraria. Instituto de agrobiotecnología. Pamplona 2010
 33. Ramírez H, et al. Recombinant small lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *The Veterinary Journal.* 190 (2011): 169-172.

34. Ramírez H, et al. Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. *Viruses* 5 (2013) 1175-1207.
35. Rodríguez R. Efecto del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) sobre células epiteliales del prepucio caprino *in vitro*. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México 2008.
36. Reina R, et al. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Vet J.* 182 (2009): 31-37.
37. Reina R, et al. Use of small ruminant lentivirus-infected rams for artificial insemination. *The Veterinary Journal* 189 (2011) 106–107.
38. Saman E. et al. A New Sensitive Serological Assay for Detection of Lentivirus Infections in Small Ruminants. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5 (1999) 734–740.
39. Sánchez G.J.H, et al. The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology* (2016) 1-5
40. Stonos N, et al. Immunogenetics of small ruminant lentiviral infections. *Viruses.* (2014):3311-33.
41. Straub O.C. Maedi–Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27 (2004) 1–5
42. Travassos C.E, et al. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research* 32 (1999) 101-106.
43. Trigo T. F. J. La Artritis Encefalitis Caprina. *Ciencia veterinaria.* 5, (1991) 49- 66.
44. Turchetti A. Distribution of caprine arthritis encephalitis virus provirus, RNA, and antigen in the reproductive tract of one naturally and seven experimentally infected bucks. *Theriogenology* 80 (2013) 933–939

Apéndice 1

Protocolo para la extracción de células y plasma de muestras de sangre

1. Centrifugar la muestra a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos para la separar la fase líquida, plasma o suero.
2. Colectar la parte líquida (suero o plasma) del tubo y almacenar en un tubo eppendorf.
3. Transferir cuidadosamente con pipeta Pasteur la capa blanca a otro tubo cónico de 15 ml.
4. Agregar solución de lisis I que contiene 5 Mm de $MgCl_2$, hasta 10 ml y homogenizar (vortex).
5. Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos y desechar el sobrenadante (decantar).
6. Repetir los pasos 4 y 5 con lisis II que contiene 5 Mm de $MgCl_2$ y 0.1% de NONIDET (NP40) con la finalidad de que las células blancas queden libres de eritrocitos.
7. En el caso de que existan remanentes importantes de eritrocitos el paquete celular puede ser tratado con 1ml de agua bidestilada y completar con 7ml de PBS. Homogenizar por 1 minuto.
8. Se homogeniza y centrifugar.
9. Se decanta y las células se deben resuspender en 300 microlitros con la misma solución de PBS y se colocan en un tubo eppendorf.
10. Etiquetar y guardar a -20 C hasta su uso.

Apéndice 2

Protocolo para la tinción de Papanicolaou (Aguilar 2009)

1. Las laminillas se fijan con OH metílico por 10 minutos y se secan al aire.
2. Se rehidratan con agua destilada por 1 minuto.
3. Se tiñen con hematoxilina por 1 minuto y posteriormente se elimina el exceso con agua corriente.
4. Se aplican 2 lavados con OH etílico al 96% por 2 minutos cada uno.
5. Se sumergen en una solución de OG6 (Orange Gal 1% en OH al 96%) por dos minutos.
6. Se aplican 2 lavados con OH al 96% por 2 minutos.
7. Se sumergen en una solución de EA (Eosina al 0.5%, pardo Bismark al 0.5% y verde brillante al 0.5%) por 3 minutos.
8. Se aplican 2 lavados con OH al 96% por 5 minutos.
9. Se aplica un lavado con OH absoluto por 2 minutos.
10. Se sumergen en una solución de OH absoluto con xilol en una proporción de 50/50 por 2 minutos.
11. Se sumergen en xilol, dos baños por 2 minutos.
12. Se montan con resina y se dejan secar para su observación.

Apéndice 3

Protocolo para la realización de ELISAs comerciales

ELITEST

Preparación

1. Mantenga el material a temperatura ambiente (25-30°C) hasta su uso.
2. La solución de lavado debe ser preparada por dilución de la solución concentrada de lavado 1:25 con agua destilada o agua desionizada, ej. para diluir 20ml en 500ml.

Nota: pueden formarse cristales en el concentrado de la solución de lavado después de almacenarlo de 2-8° C. Estos cristales deben ser completamente disueltos a una temperatura de 37°C.

La solución de lavado se debe mantener a temperatura ambiente hasta su uso.

3. Trabajar con una predilución 1:100 para las muestras y los controles, ej. 4µl de suero en 400µl de diluyente de muestra.
4. El conjugado debe ser preparado diluyendo el conjugado concentrado 1:100 con buffer del conjugado, ej. diluir 10µl por tira o 100µl en 10 ml por placa redactar
5. El sustrato debe ser preparado por dilución del concentrado TMB en 1:100 con el buffer del sustrato, ej. dilución de 10µl en 1ml para una tira o 100µl en 10ml para una placa.

Procedimiento del ensayo

Antes de comenzar con el ensayo ajustar la temperatura de la estufa a 37°C.

1. Colocar en el soporte el número de tiras requerido, tomar en cuenta los espacios requeridos para un control negativo y uno positivo. Si se llegan a usar más tiras en una corrida, se tendrán que agregar 2 tiras control en el soporte.

2. Hacer una predilución 1:100 de las muestras y controles. Ej. 4µl de suero en 396 µl de diluyente de la muestra. No usar volúmenes pequeños de suero o plasma (ej. 1 µl o menos) esto para prevenir errores en el pipeteo.

Adición de reactivos

3. Agregar 80 µl de diluyente en cada pozo de la placa.
4. Agregar 20 µl de muestra diluida y control en su apropiado pozo. Asegurarse de que la muestra y el control estén completamente mezclados en el diluyente con un agitador de microplaca (1000 rpm) o manualmente por pipeteo hacia arriba y hacia abajo por lo menos 5 veces.
5. Cubrir las tiras con un sellador adhesivo.

Incubar por 60 minutos a 37°C

6. Lavar cada pozo 5 veces
7. Agregar 100 µl de la solución de conjugado prediluida en cada pozo
8. Cubrir las tiras con un sellador adhesivo. Incubar por 60 minutos a 37°C
9. Lavar cada pozo 5 veces
10. Agregar 100 µl de solución prediluida de sustrato a cada pozo
11. Incubar por 30 minutos de 20 a 25 °C
12. Para detener la reacción, agregar 100 µl de solución de paro a cada pozo, en la misma secuencia y en los mismos intervalos de tiempo que la solución de sustrato.
13. Leer (15 minutos después del paso 12) la absorbancia de la solución en los pozos a 450 nm.

Interpretación

Abreviación

P= absorbancia de los controles positivos

N= absorbancia de los controles negativos

S= absorbancia de las muestras de la prueba

Validación

Checar la validez de los controles positivos y negativos (a una absorbancia de entre 450 y 595 nm).

1. Cada uno de los controles negativos debe ser ≤ 0.100 .
2. Calculara N excluyendo los controles fuera del rango especificado.
3. Cada uno de los controles positivos debe estar dentro del rango indicado en el folleto contenido en el kit.
4. Calcular P excluyendo los controles de rango especificado.

Si más de la mitad de los controles han sido eliminados la prueba deberá ser repetida después de una cuidadosa investigación en busca de posibles errores.

Resultados de la prueba

Calcular el corte así: $(P-N)/4+N$

Una muestra es no reactiva si $S < (P-N)/4+N$

La muestra es reactiva si $S \geq (P-N)/4+N$

Apéndice 4

VMRD

1. Cargar los controles y muestras de suero en la placa cubierta de antígeno con la mayor rapidez posible. El volumen de la muestra debe ser superior a los 50 µl. Golpear un lado de la placa varias veces para asegurarse que las muestras cubran la parte inferior del pozo. Teniendo cuidado de no derramar muestra de pozo a pozo. Incubar la placa una hora a temperatura ambiente (23+/-2°C)
2. Después de la hora de incubación lavar la placa en tres tiempos: Vaciar el contenido de los pozos en un fregadero y eliminar los sueros y controles restantes golpeando bruscamente las placas invertidas. Llenar inmediatamente cada pozo con solución de lavado. Vaciar la solución de lavado y golpear la placa invertida bruscamente como la anterior. Repita el proceso de lavado 2 veces más.
3. Adicionar 50 µl de conjugado a cada pozo Golpear un lado de la placa varias veces para asegurarse que las muestras cubran la parte inferior del pozo. Incubar la placa 30 minutos a temperatura ambiente (23+/-2°C)
4. Después de los 30 minutos de incubación lavar los pozos en tres tiempos como en el paso 2
5. Adicionar 50 µl de solución de sustrato a cada pozo. Golpear un lado de la placa varias veces para asegurarse que la solución de sustrato cubra la parte inferior del pozo. Incubar la placa 20 minutos a temperatura ambiente (23+/-2°C). No vaciar los pozos.
6. Adicionar 50 µl de solución de paro a cada pozo. Golpear un lado de la placa varias veces para mezclar la solución de sustrato y la solución de paro. No vaciar los pozos.
7. Inmediatamente después de agregar la solución de paro la placa debe leerse con espectrofotómetro con una densidad óptica (D.O) de 630 nm.

Calculo de porcentaje de inhibición

$$\% = 100(1 - (\text{DO muestras} \div \text{DO control negativo}))$$

Test de validación

La media de la densidad óptica del control negativo debe ser ≥ 0.300

La media del control positivo debe producir $\geq 35\%$ inhibición.

Interpretación de resultados

Si una muestra de pruebas produce $\geq 35\%$ inhibición, es positiva.

Si una muestra de pruebas produce $< 35\%$ inhibición, es negativa.

Apéndice 5

Protocolo para la elaboración de ELISAs de péptidos establecido por Aguilar, 2015.

1. Los ELISAs se realizaron en placas de 96 pozos, distribuyendo en cada pozo 300ng de péptido en 50 μ l de buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6, se incubaron las placas 16 horas a 37°C hasta conseguir la evaporación del pozo.
2. Tras dos lavados con PBS pH 7.4 conteniendo triton al 0.5% se procedió a bloquear el sitio donde no se unió el antígeno con 150 μ l de caseína al 2.5% durante 1 hora a 37°C.
3. Al finalizar el bloqueo se realizaron nuevos lavados con PBS-triton 0.5%
4. Se añadió a cada pozo 100 μ l de plasma diluido 1/20, se incubo la placa a 1 hora 37°C.
5. La placa se lavó cinco veces con PBS triton al 0.5%
6. Enseguida se añadieron 100 μ l de proteína G en cada pozo y se incubo a una hora a 37°C.
7. Transcurrida la incubación se lavó la placa como anteriormente fue descrito y se agregaron 100 μ l de cromógeno ABTS a cada pozo y se incubaron las placas de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente (22 a 26°C).
8. La lectura de absorbancia se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda a 405 nm.

El valor de corte se determinó a partir de 30 muestras de plasma seronegativos adicionando al valor promedio de absorbancia más 3 desviaciones estándar y considerando el valor de corte establecido previamente por de Andrés et al., (2013), de esta forma el valor de corte para considerar una muestra positiva fue >0.357 .

Apéndice 6

Protocolo para la extracción de ADN a partir de leucocitos de sangre periférica o células epiteliales.

Descongelar las muestras de células y verificar que tengan 300 μ l de volumen, si no es así centrifugar hasta formar un pellet en el fondo del tubo o dividir la muestra en dos microtubos.

1. Anadir 200 μ l de FATG1 Buffer y homogenizar la muestra de células otra vez con el micropeste o micromartinete.
2. Anadir 20 μ l de Proteinasa K que se encuentra en una concentración de 10mg/ml.
3. Mezclar bien por agitación y centrifugar brevemente para bajar el residuo de las paredes.
4. Incubar a 60° C por 15 minutos en el termomezclador (400 rpm) y centrifugar brevemente a 14000 rpm para remover los residuos.
5. Anadir 200 μ l de FATG2 Buffer y mezclar en vortex.
6. Incubar a 70° C por 10 minutos en el termomezclador (400 rpm) y centrifugar brevemente a 14000 rpm para remover los residuos.
7. Agregar 200 μ l de etanol (90/100), mezclar bien y centrifugar brevemente.
8. Colocar una minicolumna FATG Mini en un tubo colector de 2 ml y transferir la mezcla anterior a la mini columna y centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
9. Lavar la mini columna FATG Mini con Buffer W1 (500 μ l) y centrifugar a 14000 rpm por un minuto.
10. Deseche residuo del tubo colector.
11. Lavar la minicolumna FATG Mini en el tubo colector de 2 ml, transferir la mezcla anterior a la minicolumna y centrifugar a 14000 rpm por un minuto.
12. Deseche el residuo del tubo colector.

13. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos nuevamente para secar la minicolumna FATG Mini.
14. Colocar la minicolumna FATG Mini en el tubo de elución y añadir de 25- 30 μ l de Buffer de Elución por el centro de membrana de la columna FATG Mini y dejar reposar por 5 minutos.
15. Centrifugar a 15000 rpm durante 1 minuto y esperar 5 minutos para eluir el ADN.
16. Se toma el líquido del tubo de elución y se añade a la columna por el centro de la membrana y se deja reposar por 5 minutos para posteriormente centrifugarlo a 14000 rpm durante dos minutos.
17. Almacenar el ADN a -20 y realizar cuantificación de ADN.
18. Para la cuantificación de ADN utilizar 2 μ l de ADN muestra previa calibración con agua miliQ o agua grado biología molecular.