



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE LA REGIÓN V4 DEL GEN ENV DE  
LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES Y SU ASOCIACIÓN EN EL  
DESARROLLO DE DIFERENTES CUADROS CLÍNICOS EN OVINOS Y CAPRINOS  
INFECTADOS NATURALMENTE

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:  
ANA SILVIA GONZÁLEZ MÉNDEZ

TUTOR:  
DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ- FES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. J. SANDRA CUEVAS ROMERO-INIFAP  
M. EN C. M. MARTHA GARCÍA FLORES- CMN SIGLO XXI

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. MÉXICO MAYO DE 2018**



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.

## DEDICATORIAS

A mi padre Juan Antonio, gracias por darnos lo que tenemos, que sin ello mi camino sería diferente. A mi madre Ma. Luisa que con su esfuerzo nos ha enseñado a salir adelante y nunca rendirnos, que, sin tu apoyo, no me hubiera animado a dar un paso más, ¡gracias Méndez!

A mis hermanos y hermanas: Isaac y Luis porque siempre están para mí, en las buenas y en las malas apoyando siempre, gracias por mantenerme; Elizabeth y Raquel, por aconsejar y escucharme siempre muchas gracias changuitas. Rubén y Abraham por dar tanta lata al escribir esta tesis, su alegría y risas es lo más hermoso que me han dado, espero ser su guía y busquen más en su vida.

A Fernando gracias por darme la oportunidad de ser parte de tu vida, escucharme, tranquilizarme y siempre apoyarme, en verdad mil gracias :3 y seguir con mas retos.

A la generación más increíble: Nely, Sandy, Marquitos, Pavel y David, por las risas en todo momento y alegrar las clases.

A Yesica y Carlos por ayudarme en mis tramites, en mis muestras en todo, gracias por ser  
A la Dra. Martha y el Dr. Alejandro, gracias por seguir guiándome, ayudando y ser grandes amigos.

Dr. Hugo mi tutor, gracias por apoyar cuando la decisión era ya no volver a intentarlo, gracias por eso, tenemos una gran tesis, gracias por ser amigo y tutor.

A todo el Laboratorio de genética y virología molecular gracias.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue apoyado y financiado por:

- ∴ **ELISAs basadas en el uso de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos para la detección serológica de lentivirus en caprinos**, con clave IT201217. Financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).
- ∴ **Uso de herramientas moleculares y bioinformáticas para la identificación de agentes infecciosos**, con clave PIAPI1610. Dentro del Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación.
- ∴ **Genotipificación del gen *env* de retrovirus que impactan la salud de rumiantes domésticos**, con clave **No. 221285**. Proyecto financiado por CONACyT.

Al programa de becas CONACYT, por su compromiso en el apoyo a los estudiantes de posgrado.

A los Médicos de campo y doctores que colaboraron con este proyecto: Dr. Humberto A. Martínez Rodríguez, Dr. Jorge Luís Tortora Pérez, Dr. Álvaro Aguilar, Dra. Mónica Salas Rojas, Dr. Raúl, Dr. Toño, Othón, Dr. Efrén Díaz Aparicio, José Clemente Leyva Corona, Enrique Herrera López y Raúl Avalos Castro.

Al comité tutor Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero, M. en C. M. Martha García Flores, por todas sus aportaciones y comentarios que ayudaron a enriquecer el trabajo.

Al jurado Dra. Rosa Elena y a la Dra. Ericka Nelly por su tiempo proporcionado en la revisión y consejos.

## RESUMEN

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) en ovejas y cabras son agentes causales de neumonía, meningoencefalitis, mastitis, artritis. Sin embargo hasta el 50% de los casos son asintomáticos. La glicoproteína de superficie (proteína SU) de los *Lentiviruses* se divide en regiones conservadas (C1-C4) y variables (V1-V5). La región V4 de LVPR es responsable del tropismo y el desarrollo de síntomas clínicos y es homóloga a la región V3 de lentivirus humanos (VIH). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar la variabilidad de la región V4 de la proteína SU y su posible relación con los síntomas clínicos de ovinos y caprinos infectados naturalmente. Se obtuvieron leucocitos de sangre periférica (LSP) y tejidos animales (asintomáticos, artritis, mastitis y neumonía). El ADN provírico de LVPR se detectó mediante PCR anidada y los amplicones resultantes se analizaron mediante secuenciación nucleotídica automatizada de Sanger. Se detectó la env (V4) del provirus en 94 muestras de LSP y 54 muestras de tejidos, obteniendo solo 87 secuencias (51 de LSP y 36 de tejidos). Se construyó un árbol filogenético a partir de secuencias de referencia y las obtenidas, agrupando 75 con genotipo B y 12 con genotipo A. La deducción de secuencias de aminoácidos mostró un rango de similitud de 75.35% al 93.29%, sinónimo y sustituciones no sinónimas (dS / dn) en un rango de 0.15 a 0.75, y diversidad genética de 11.9% al 29.6%. Además, se encontraron regiones altamente variables y regiones conservadas entre las secuencias obtenidas. Se observó un posible patrón firma para los animales asintomáticos infectados con el genotipo A fue 54-I, 78-G, 79-R, y 82-I; el patrón firma para los animales asintomáticos infectados con el genotipo B fue 54-G/T, 78- R/K, 79-N/K/G, 82-T/A y el patrón firma para los animales con artritis-mastitis infectados con el genotipo B fue 54-N/G, 78-K/R, 79-D/G/K, 82-K/A, así como en el bazo en la posición 79-N/G y 82-R y en glándula mamaria en la posición 79-K. De manera colectiva, estos datos sugieren que existe una asociación con la presencia de patrones moleculares en función al genotipo.

PALABRAS CLAVE: LVPR, env, V4, LSP, Ovinos, Caprinos y Secuencias

## **ABSTRACT**

Small Ruminants Lentiviruses (SRLV) are cause agents of pneumonia, meningoencephalitis, mastitis, arthritis and asymptomatic in up to 50% of the cases. The lentivirus surface glycoprotein (SU Protein) is divided into conserved (C1-C4) and variable (V1-V5) regions. The V4 region of SRLV is responsible for tropism and the development of clinical stage and is homologous to the V3 region of human lentiviruses (HIV). Therefore, the objective of this work was to analyze the variability of the V4 region of the SU protein and its possible relation with clinical symptoms in goats and sheep naturally infected. Peripheral blood leukocytes (PBL) and animal tissues were obtained (asymptomatic, arthritis, mastitis and pneumonia). The proviral DNA of SRLV was detected by nested PCR and the resulting amplicons were analyzed by automated Sanger nucleotide sequencing. The env (V4) of the provirus was detected in 94 LSP samples and 54 tissue samples, obtaining only 87 sequences (51 of LSP and 36 of tissues). A phylogenetic tree was constructed from reference sequences and those obtained, grouping 75 with genotype B and 12 with genotype A. The deduction of aminoacid sequences showed a range of similarity of 75.35% to 93.29%, synonym and non-synonymous substitutions (dS/dn) in a range of 0.15 to 0.75, and a genetic diversity of 11.9% to 29.6%. Additionally, some highly variable regions and conserved regions were found between the obtained sequences. A possible signature pattern was observed for asymptomatic animals infected with the A genotype was 54-T, 78-G, 79-R, and 82-T; The signature pattern for asymptomatic animals infected with the B genotype was 54-G / T, 78-R / K, 79-N / K / G, 82-T / A and the signature pattern for animals with infected arthritis-mastitis with the B genotype was 54-N / G, 78-K / R, 79-D / G / K, 82-K / A, as well as in the spleen at position 79-N / G and 82-R and in mammary gland in the 79-K position. Collectively, these data suggest that there is an association with the presence of molecular patterns depending on the genotype.

Key words: SRLV, env, V4, PBL, Sheep, Goat and Sequence.

## ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 SIGNOS CLÍNICOS.....	2
1.1.1 FORMA NERVIOSA.....	2
1.1.2 FORMA ARTRÍTICA.....	2
1.1.3 FORMA MAMARIA.....	3
1.1.4 FORMA RESPIRATORIA.....	3
1.2 TRANSMISIÓN.....	3
1.3 DIAGNÓSTICO.....	4
1.4 ETIOLOGÍA.....	6
1.4.1 GENES.....	7
1.4.2 GENOTIPOS.....	8
1.4.3 CICLO DE REPLICACIÓN.....	10
1.4.3.1 TRANSPORTE AL NÚCLEO.....	11
1.4.3.2 INTEGRACIÓN.....	11
1.4.3.3. TRANSCRIPCIÓN.....	12
1.4.3.4. TRADUCCIÓN.....	12
1.4.3.5. ENSAMBLE.....	13
1.4.3.6. LIBERACIÓN.....	14
1.4.3.7. MADURACIÓN.....	14
1.5 VARIABILIDAD GENÉTICA.....	14
1.6. TROPISMO.....	16
1.6.1 ESPECIE HUÉSPED.....	16
1.6.2. TIPO CELULAR.....	16
1.6.3 TIPO DE TEJIDO.....	17
1.7 PATRONES FIRMA EN OTROS VIRUS.....	18
1.7.1 VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....	16
1.7.2 VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA Y VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA DEL SIMIO.....	19
1.7.3 VIRUS DEL DISTEMPER CANINO (VDC) .....	19
1.7.4 VIRUS DE NEWCASTLE (VDN).....	20
1.8 MODELADO DE PROTEÍNA.....	21
1.8.1 ESTRUCTURA Y CONFORMACIÓN DE ASAS.....	21
2. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
5.1 ANIMALES DE ESTUDIOS.....	25
5.2 MUESTRAS.....	25
5.2.1 TOMA DE MUESTRAS.....	25
5.2.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	26
5.3 IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES INFECTADOS POR LVPR.....	26
5.4 INICIADORES DE LAS PCR.....	26
5.4.1 DISEÑO DE INICIADORES DEL GEN <i>env</i> Y DE LA REGIÓN V4.....	26
5.5 CONTROL POSITIVO DE PARA LA PCR DEL GEN <i>env</i> Y DE LA REGIÓN V4.....	27
5.6 EXTRACCIÓN DE ADN.....	28
5.7 DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL DE LVPR.....	29

5.7.1 PCR <i>env</i> (primera ronda).....	29
5.7.2 PCR <i>env</i> V4.....	30
5.7.3 GEN ENDÓGENO SUCCINATO DESHIDROGENASA (SDHA).....	31
5.8 ELECTROFORESIS.....	32
5.9 PURIFICACIÓN.....	32
5.10 SECUENCIACIÓN, ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y EDICIÓN DE SECUENCIAS.....	32
5.10.1 GENOTIPIFICACIÓN (ÁRBOLES FILOGENÉTICOS) .....	33
5.10.2 VARIABILIDAD GENÉTICA (DISTANCIA GENÉTICA Y SUSTITUCIONES SINÓNIMAS Y NO SINÓNIMAS).....	33
5.10.3 PATRONES FIRMA Y ENTROPÍA.....	34
6. RESULTADOS.....	36
6.1 SEROLOGÍA.....	36
6.2 DETECCIÓN DE LA REGIÓN V4 DEL GEN <i>env</i> , MEDIANTE PCR.....	36
6.3 PCR SDHA.....	38
6.4 SECUENCIACIÓN.....	39
6.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	41
6.5.1 GENOTIPIFICACIÓN CON ÁRBOLES FILOGENÉTICOS CONSTRUIDOS CON MrBayes.....	41
6.5.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO CON MAXIMUM-LIKELIHOOD.....	44
6.5.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LSP CON MAXIMUM LIKELIHOOD.....	45
6.5.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS TEJIDOS CON MAXIMUM LIKELIHOOD.....	46
6.6 ALINEAMIENTOS.....	47
6.7 MATRIZ DE IDENTIDAD.....	53
6.8 SINÓNIMOS (dS) Y NO SINÓNIMOS (dN) .....	54
6.9 DISTANCIA GENÉTICA.....	55
6.10 VESPA® (VIRAL EPIDEMIOLOGY SIGNATURE PATTERN ANALYSIS) .....	56
6.10.1. SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A, COMPARADAS CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A.....	56
6.10.2 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO B, COMPARADAS CON UNA SECUENCIA DE UN ANIMAL ASINTOMÁTICO GENOTIPO B.....	57
6.10.3 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CON ARTRITIS GENOTIPO B.....	57
6.10.4 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE TEJIDOS DE ANIMALES CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CON ARTRITIS GENOTIPO B.....	58
6.10.5 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE TEJIDOS DE ANIMALES CON CUADRO RESPIRATORIO GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CUADRO RESPITARORIO-MASTITICO GENOTIPO B.....	59
6.11 ENTROPÍA.....	59
6.11.1 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A, COMPARADAS CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A.....	60
6.11.2 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO B, COMPARADAS CON UNA SECUENCIA DE UN ANIMAL ASINTOMÁTICO GENOTIPO B.....	60
6.11.3 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CON ARTRITIS GENOTIPO B.....	61

6.11.4 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE TEJIDOS DE ANIMALES CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CON ARTRITIS GENOTIPO B.....	62
6.11.5 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE TEJIDOS DE ANIMALES CON CUADRO RESPIRATORIO GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CUADRO RESPIRATORIO-MASTITICO GENOTIPO B.....	62
6.12 SECUENCIAS OBTENIDAS POR TEJIDO (CUASIESPECIES).....	64
6.13 CONSENSO.....	66
6.13.1 SECUENCIAS DE LVPR CONSENSO DERIVADAS DE LSP.....	66
6.13.2 ESQUEMATIZACIÓN DE LA ÚLTIMA BUCLE DE V4 DE LVPR DE SECUENCIAS CONSENSO.....	67
6.13.3 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE SECUENCIAS DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A.....	68
6.13.4 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE SECUENCIAS DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO B.....	69
6.13.5 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE SECUENCIAS DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B.....	70
6.13.6 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE LA SECUENCIA 179 OBTENIDA DE LSP DE UN ANIMAL CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B.....	70
6.13.7 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE LA SECUENCIA 119S OBTENIDA DE LSP DE UN ANIMAL ASINTOMÁTICO GENOTIPO B.....	71
7. DISCUSIÓN.....	72
8. CONCLUSIONES.....	79
9.ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	80
10.REFERENCIAS.....	84
11. ANEXO 1.....	95
11.1 SOLUCIONES.....	95
11.1.1 SOLUCIÓN DE LISIS 1.....	95
11.1.2 SOLUCIÓN DE LISIS 2.....	95
11.1.3 SOLUCIÓN SALINA TAMPONADA DE FOSFATOS (PBS) .....	95
11.1.4 TAE 50X PARA 1L.....	95
11.2 SEPARACIÓN DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	96
12. ANEXO 2.....	97
12.1 MECANISMO DEL COMPLEJO DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	97
13. APÉNDICE 1.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de los LVPR.....	6
Figura 2: Árbol filogenético generado a partir de secuencias completas de LVPR que ilustran los principales genotipos (A-E) .....	9
Figura 3: Distribución de genotipos de LVPR de cabras y borregos en diferentes países.....	9
Figura 4: Ciclo de replicación de retrovirus.....	12
Figura 5: Ruta de ensamble, liberación y maduración del virus de VIH. (Modificado) .....	13
Figura 6: Estructura de la glicoproteína 120 VIH.....	18
Figura 7: Alineación de la región V4 de la proteína SU de LVPR.....	22
Figura 8: Condiciones de amplificación de la PCR <i>env</i> , primera ronda.....	30
Figura 9: Condiciones de amplificación de la PCR- <i>env</i> V4.....	31
Figura 10: Las condiciones de amplificación para la PCR-SDHA.....	32
Figura 11: Análisis electroforético en geles de agarosa al 1.5% de los producto amplificados de la PCR-V4. ....	37
Figura 12: Productos de amplificación de la PCR-SDHA de muestras negativas a la PCR-V4 de LVPR.....	38
Figura 13: Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5% de los productos purificados de la PCR-V4....	40
Figura 14: Ejemplo del Blastn de una secuencia de nucleótidos obtenida con la PCR-V4.....	41
Figura 15: Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas de la región V4 del gen <i>env</i> de LVPR de muestras obtenidas en el presente estudio y de referencia.....	42
Figura 16: Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas de la región V4 del gen <i>env</i> de LVPR de muestras discrepantes en el árbol anterior y de referencia.....	43
Figura 17: Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas de la región V4 del gen <i>env</i> de LVPR de muestras obtenidas en el estudio.....	44
Figura 18: Árbol filogenético construido con secuencias de aminoácidos deducidos de la región V4 del gen <i>env</i> de LVPR de LSP.....	45
Figura 19: Árbol filogenético de construido con secuencias deducidas aminoacidicas de la región V4 del gen <i>env</i> de LVPR de tejidos.....	46
Figura 20: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de LSP de animales asintomáticos del genotipo A.....	51
Figura 21: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de LSP de animales asintomáticos del genotipo B.....	48
Figura 22: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de LSP de animales con cuadro clínico de artritis, mastitis y artritis-mastitis del genotipo B.....	49
Figura 23: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de tejido de animales con cuadro artritis-mastitis del genotipo B.....	50
Figura 24: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de tejido de animales con cuadro Respiratorio del genotipo B.....	51
Figura 25- Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR atípicas. Anotación en rojo; cisteínas conservadas en las secuencias.....	52
Figura 26: Gráfica de probabilidad de las posiciones de aminoácidos en la región V4 de LVPR mostrando patrones firma de muestras de animales asintomáticos del genotipo A Vs secuencias de referencia de animales asintomáticos del mismo genotipo.....	56
Figura 27: Gráfica de probabilidad de las posiciones de aminoácidos en la región V4 de LVPR mostrando patrones firma de muestras de LSP de animales asintomáticos genotipo B, comparadas con una secuencia de un animal asintomático genotipo B.....	57
Figura 28: Gráfica de probabilidad de las posiciones de aminoácidos en la región V4 de LVPR mostrando patrones firma de muestras de LSP de animales con artritis-mastitis genotipo B contra secuencias de referencia de animales artríticos genotipo B.....	58

Figura 29: Gráfica de probabilidad de las posiciones de aminoácidos en la región V4 de LVPR mostrando patrones firma de muestras de tejidos de animales con artritis-mastitis genotipo B contra secuencias de referencia de animales artríticos genotipo.....	58
Figura 30: Gráfica de probabilidad de las posiciones de aminoácidos en la región V4 de LVPR mostrando patrones firma de muestras de Tejidos de animales con cuadro respiratorio genotipo B comparado con secuencia de referencia de animales con cuadro respiratorio-mastitis genotipo B.....	59
Figura 31: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de animales asintomáticos genotipo A contra secuencias de referencia de animales asintomáticos genotipo A.....	60
Figura 32: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de animales asintomáticos genotipo B contra secuencias de un animal asintomático (27-G) genotipo B.....	61
Figura 33: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de LSP de animales con cuadro artritis-mastitis genotipo B contra secuencias de referencia de animales con cuadro artrítico genotipo B..	61
Figura 34: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de tejidos de animales con cuadro de artritis-mastitis genotipo B contra secuencias de referencia de animales con cuadro de mastitis genotipo B.....	62
Figura 35: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de tejidos de animales con cuadro respiratorio genotipo B contra una secuencia de referencia de un animal con cuadro respiratorio-mastitis genotipo B.....	63
Figura 36: Alineamiento de aminoácidos de la región V4 de LVPR que muestra las posiciones 51 a la 83 del bazo obtenido de diferentes animales.....	65
Figura 37: Alineamiento de aminoácidos de la región V4 de LVPR que muestra las posiciones 51 a la 83 de la glándula mamaria obtenido de diferentes animales.....	66
Figura 38: Alineamiento de secuencias consenso.....	67
Figura 39: Representación esquemática del bucle principal por fase clínica, formada entre las posiciones 45 a la 83 y generada a partir de las secuencias consenso obtenidas en el presente trabajo.....	68
Figura 40: Modelamiento de la proteína V4 obtenida de LSP de animales asintomáticos genotipo A.....	69
Figura 41: Modelamiento de la proteína V4 obtenidas de LSP de animales asintomáticos genotipo B.....	69
Figura 42: Modelamiento de la proteína V4 obtenidas de LSP animales con artritis-mastitis genotipo B....	70
Figura 43: Modelamiento de la proteína V4 de la secuencia 179 obtenida de LSP de un animal con artritis-mastitis genotipo B.....	70
Figura 44: Modelamiento de la proteína V4 de la secuencia 119S obtenida de LSP de un animal con artritis-mastitis genotipo B.....	71
Figura 45: Mecanismo del complejo de retrotranscripción.....	98
Figura 46: Muestras seropositivas a LVPR utilizando un ELISA competitivo comercial mostradas por especie y Estado del país.....	99
Figura 47: Gráfica de serología positiva a LVPR de ovinos por raza porcentaje, evaluados con una técnica de ELISA competitivo.....	100
Figura 48: Gráfica de serología positiva a LVPR de caprinos por raza.....	101
Figura 49: Gráfica de serología positiva a LVPR en ovinos y caprinos por sexo.....	102
Figura 50: Serología positiva a LVPR por edad en ovinos y caprinos.....	103
Figura 51: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 10).....	104
Figura 52: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 59).....	105
Figura 53: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 78).....	105
Figura 54: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 104).....	106
Figura 55: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 179).....	106
Figura 56: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 149).....	107
Figura 57: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 342).....	107
Figura 58: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 566).....	107

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Distribución de subtipos del genotipo A por país y especie.....	10
Cuadro 2: Secuencias de los iniciadores utilizados en las PCR y producto de amplificación.....	27
Cuadro 3: Reactivos y condiciones para la obtener el cDNA de LVPR cepa FES-752.....	28
Cuadro 4: Reactivos de la mezcla de reacción de la PCR- <i>env</i> (primera ronda).....	29
Cuadro 5: Mezcla de reacción para la PCR- <i>env</i> (V4) anidada.....	30
Cuadro 6: Mezcla de reacción para la PCR del gen constitutivo SDHA.....	31
Cuadro 7: Muestras de tejidos evaluadas por PCR-V4 para la detección de ADN proviral de LVPR.....	38
Cuadro 8: Resultados obtenidos de las pruebas de ELISA, PCR y de las secuencias obtenidas de LSP de caprinos infectados por LVPR, distribuidos por fase clínica y Estado del país.....	39
Cuadro 9: Resultados obtenidos de las pruebas de ELISA, PCR y de las secuencias obtenidas de LSP de ovinos infectados por LVPR, distribuidos por Estado del país.....	40
Cuadro 10: Rangos de similitud entre las secuencias de aminoácidos de LVPR obtenidas en el presente estudio y con secuencias de referencia.....	53
Cuadro 11: Resultados obtenidos del análisis de secuencias nucleotídicas de LVPR determinando las sustituciones no sinónimas (dN) y sustituciones sinónimas (dS).....	54
Cuadro 12: Valores comparativos de la distancia genética entre las secuencias de los diferentes cuadros clínicos.....	55
Cuadro 13: Posiciones identificadas en los programas de ENTROPY y VESPA por cuadro clínico.....	63
Cuadro 14: Posiciones relevantes y aminoácidos presente por cuadro clínico de artritis-mastitis.....	64
Cuadro 15: Posiciones de aminoácidos relevantes halladas en los diferentes tejidos.....	65
Cuadro 16: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR con una técnica de ELISA competitiva por Estado de la República y especie.....	99
Cuadro 17: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR por razas ovinas y expresados en porcentaje, evaluados con una técnica de ELISA competitivo.....	100
Cuadro 18: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR por razas caprinas y expresados en porcentaje, evaluados con una técnica de ELISA competitivo.....	101
Cuadro 19: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR en ovinos y caprinos por sexo y expresado en porcentaje, evaluados con una técnica de ELISA competitivo.....	102
Cuadro 20: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR en ovinos y caprinos clasificados por edad y expresados en porcentaje, evaluados con una técnica de ELISA competitivo.....	103
Cuadro 21: Comparación de resultados de Serología y PCR-V4.....	104

## 1. INTRODUCCIÓN

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) y la Neumonía Progresiva Ovina o Maedi-Visna (MV) son enfermedades causadas por Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) en cabras y borregos respectivamente. La AEC es una infección permanente y de progresión lenta asociada con encefalitis, artritis y / o mastitis, mientras que la enfermedad de MV es una infección crónica multisistémica progresiva, clínicamente caracterizada por desgaste (visna) y dificultad para respirar (maedi) asociada con neumonía. El efecto económico de LVPR, a menudo subestimado y aunque continúa bajo estudio, se sabe que depende de factores relacionados con el medio ambiente, la raza, la susceptibilidad individual, el sistema de producción, las prácticas agrícolas y la edad de sacrificio<sup>1,2</sup>. Por su parte, el impacto productivo de LVPR esta reflejado por la eliminación prematura de animales enfermos por lo que la tasa de reemplazo aumenta, además de que puede afectar negativamente la calidad de la leche y parece desencadenar un aumento en el número de células somáticas<sup>3</sup>.

La AEC ha sido documentada en Estados Unidos, Canadá, Australia, Francia, Nueva Zelanda, Suiza, Kenia, Gran Bretaña y México, entre otros países. Tiene el riesgo de difundirse a otras regiones a través del comercio internacional de productos o subproductos caprinos<sup>4,5</sup>. Cork en 1973 detectó la leucoencefalomielitis en cabritos de 1-4 meses; Adams en 1979 determinó la artritis crónica de cabras adultas llamándola síndrome de artritis encefalitis caprina (AEC). La enfermedad de MV se describió por primera vez en Sudáfrica en 1915, posteriormente se reportó en los Estados Unidos de Norteamérica en 1923 y 15 años después en Islandia. Desde entonces, la infección se ha reportado en la mayoría de los países en donde se crían ovinos incluyendo Bélgica, Canadá, Francia, Alemania, Holanda, España, Italia, Grecia, Hungría, Bulgaria, Rumania, Suiza, Israel, Kirguisa, Rusia , Kenia, India, Sudáfrica, Estados Unidos y Perú<sup>6</sup>.

En México, la primera identificación de AEC se realizó mediante un estudio serológico en cabras importadas de los Estados Unidos en 1984 por Adams et al. (1984). Diversos estudios han documentado que la infección por LVPR se ha extendido entre las cabras de distintas regiones de México, causando principalmente artritis crónica, mientras que la infección en ovejas ha sido pobremente descrita. En los últimos años, animales vivos y semen se han importado a México desde Francia y los Estados Unidos sin que se hayan realizado pruebas diagnósticas que detecten la infección por LVPR<sup>7</sup>.

### **1.1 SIGNOS CLÍNICOS**

La mayoría de las cabras y ovinos infectados no desarrollan cuadros clínicos y solo un 30 a 40% desarrollan signología clínica<sup>8</sup>. Se describen cuatro presentaciones clínicas principales:

**1.1.1 FORMA NERVIOSA:** la cual afecta a cabritos presentando debilidad en el tren posterior y ataxia, seguida por cuadriplejía. En ovejas mayores a dos años se presenta incoordinación llegando incluso a la parálisis de las extremidades posteriores y anteriores, pero responde a estímulos externos sin cambios en el consumo de alimento<sup>9</sup>.

**1.1.2 FORMA ARTRÍTICA:** esta manifestación clínica se caracteriza por una hipertrofia de la articulación, artritis proliferativa crónica y sinovitis que provoca cojera y marcha dificultosa en el animal. Afecta principalmente a cabras de entre 2 y 3 años de edad<sup>10</sup>. El signo clínico más evidente es la cojera, pues fundamentalmente están afectadas las articulaciones carpal y tarsal. En menor medida también pueden estar afectadas las articulaciones atlanto-occipital y coxofemoral. Lo primero que se observa es edema y congestión de la membrana sinovial y cápsula articular, lo que provoca un engrosamiento de ambas estructuras, el líquido articular puede aparecer turbio. Hay proliferación de la membrana sinovial e infiltración subsinovial de células mononucleares, manguitos perivasculares y depósitos de fibrina en la membrana sinovial. También pueden verse afectadas la cápsula articular y

tejido conjuntivo periarticular en los que se aprecian áreas necróticas y calcificaciones. Finalmente, la artrosis evoluciona a anquilosis debido a la calcificación o fibrosis<sup>10, 11</sup>.

**1.1.3 FORMA MAMARIA:** es la segunda en importancia debido a las pérdidas económicas y a la frecuencia de aparición. Afecta a animales adultos de entre los 3 y 5 años de edad, pero también se ha observado en animales de un año de edad. Se produce una mastitis subclínica, indurativa, crónica, difusa, bilateral y no dolorosa, con tumefacción de nódulos linfáticos mamarios. Es una mastitis intersticial crónica caracterizada por infiltración de células mononucleares alrededor de los acines glandulares y conductos galactóforos, produciendo descamación de los mismos<sup>11</sup>.

**1.1.4 FORMA RESPIRATORIA:** es común en ovinos y resulta evidente hasta los 4 ó 5 años de edad, existe una pérdida de peso gradual, dificultad respiratoria que evoluciona lentamente; la tos y el flujo nasal se presentan en casos avanzados<sup>12</sup>.

## **1.2 TRANSMISIÓN**

La transmisión lactogénica (leche y calostro) se ha asumido como la principal vía de transmisión durante muchos años; sin embargo, además del calostro/leche, también el contacto con líquido pulmonar, semen, secreciones nasales, saliva y orina pueden ser fuentes de transmisión de LVPR<sup>13</sup>. Igualmente, el contacto cercano entre animales infectados y susceptibles por el hacinamiento en instalaciones de confinamiento o en regiones invernales favorece la transmisión. El aumento de la seroprevalencia en un rebaño se puede deber a la incorporación de nuevos animales, períodos largos de alojamiento, aumento de la presión de infección, menor ventilación y alta densidad de población en los corrales<sup>14</sup>. La transmisión sexual se ha demostrado con la presencia de LVPR en el aparato genital de machos y en el semen<sup>15</sup>. Además, las hembras pueden ser infectadas experimentalmente mediante inseminación artificial<sup>16</sup>. La vía de transmisión

transplacentaria es un tema controversial, algunos autores han aportado evidencias a favor de esta vía de transmisión, mientras que otros han obtenido datos contrarios. Un estudio demostró que las células epiteliales del oviducto pueden ser infectadas in vitro con el LVPR, aunque aun no existen reportes in vivo<sup>17</sup>, se ha detectado la presencia del virus en lavados de oviducto y en tejido de útero<sup>18</sup>, existen reportes de infección directa de embriones y fetos de manera experimental<sup>19</sup>. Han surgido reportes en cabritos aislados alimentados con leche pasteurizada o sustitutos lácteos en programas de control y se ha presentado hasta 10% de seroconversión<sup>20</sup>. Aunque los fómites, instalaciones y equipo pueden ser medios de infección, hoy en día parecen también cobrar fuerza la transmisión iatrogénica por medio de agujas/jeringas e instrumentos contaminados reutilizados<sup>13</sup>. LVPRs que afectan la vida silvestre ya han sido identificados, lo que demuestra la existencia de virus emergentes adaptados a nuevos huéspedes, los cuales pueden adquirir nuevas propiedades biopatológicas<sup>21</sup>.

### **1.3 DIAGNÓSTICO**

La mayoría de los animales infectados por lentivirus permanecen asintomáticos, por lo que el diagnóstico es una herramienta imprescindible para la identificación de la infección<sup>22</sup>. La detección de la infección por LVPR generalmente se realiza por medio de métodos serológicos. En la actualidad, se han descrito más de 30 ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-LVPR<sup>22</sup>, siendo los más usados los ensayos indirectos y competitivos, ensayos de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) las técnicas confirmatorias Radioinmunoprecipitación (RIPA) y el Western Blot (WB)<sup>23</sup>. El WB es considerado una prueba de elevada sensibilidad (equivalente a 97.8%) y que resulta muy útil como prueba confirmatoria “prueba de oro o referencia” para los ensayos de anticuerpos frente a LVPR<sup>24</sup>. La reactividad antigénica cruzada entre lentivirus ovino y caprino de los productos del gen *gag* y *env* (véase más adelante) es bien conocida y por

tanto la preparación de antígenos de lentivirus ovino son los más ampliamente usados en las pruebas serológicas para diagnóstico <sup>24</sup>.

Los métodos de diagnóstico *in vitro* en general tienen muchos inconvenientes, además de ser costoso, carece de líneas celulares permisivas y el rendimiento en la producción viral es bajo<sup>25</sup>. A este respecto, las líneas celulares más utilizadas para el cultivo de LVPR son los fibroblastos de plexo coroideo de corderos en el caso de MVV<sup>25</sup>, feto ovino, pulmón de ovino y membrana sinovial de cabra, células corneales ovinas<sup>9</sup>, y se utilizan cocultivo de macrófagos (derivados de monocitos sanguíneos) con células fibroepiteliales, donde se puede observar un efecto citopático que consiste células gigantes multinucleadas, aunque esto depende de la cepa viral o si el virus permanece latente<sup>9</sup>. Sin embargo, la OIE recomienda fijar los cultivos y observar el antígeno vírico por inmunomarcaje (mediante inmunofluorescencia indirecta o inmunoperoxidasa)<sup>22</sup>.

Los métodos inmunohistoquímicos, que permiten la detección de antígenos virales mediante anticuerpos específicos en muestras histológicas, frotis o preparaciones citológicas, no se aplican comúnmente en diagnósticos diferenciales de rutina en animales vivos, debido al costo, baja disponibilidad de reactivos y muestras y sensibilidad limitada de algunas de estas técnicas [175]. Métodos de hibridación *in situ* para estudios histológicos, solo se utiliza con fines de investigación <sup>26,27</sup>.

La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR, *por sus siglas en inglés*) se ha utilizado en diferentes estudios para la detección temprana del provirus<sup>28-31</sup>. Su alta especificidad ha permitido investigar la viremia en distintas especies de animales, incluyendo los animales jóvenes que recibieron anticuerpos maternos calostrales<sup>32</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que un intensivo muestreo a intervalos cortos para la búsqueda de anticuerpos contra LVPR y detección de ADN proviral, pueden favorecer la detección temprana de los animales infectados<sup>33</sup>. En este contexto, la PCR dirigida a secuencias de LTR del ADN

proviral ha demostrado tener un 90% y 78% de sensibilidad en ovinos clínicamente y subclínicamente infectados respectivamente<sup>32</sup>.

#### 1.4 ETIOLOGÍA

Los LVPR pertenecen a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* y al género *Lentivirus*, el cual incluye a los virus de inmunodeficiencia de los simios (VIS), inmunodeficiencia de los felinos (VIF), inmunodeficiencia de los bovinos (BIV) y anemia infecciosa equina (VAIE)<sup>13</sup>.

Los LVPR incluyen en el interior de su nucleocápside (NC) las enzimas proteasa (PR) e integrasa (IN) y el genoma de dos subunidades de una sola cadena positiva de ARN de 8.4 a 9.2 kb, tienen un diámetro de 80-100 nm. La cápside (CA) tiene una morfología icosaédrica de unos 60 nm, contiene una proteína de matriz (MA) y una envoltura (ENV) (figura 1)<sup>13, 8</sup>.

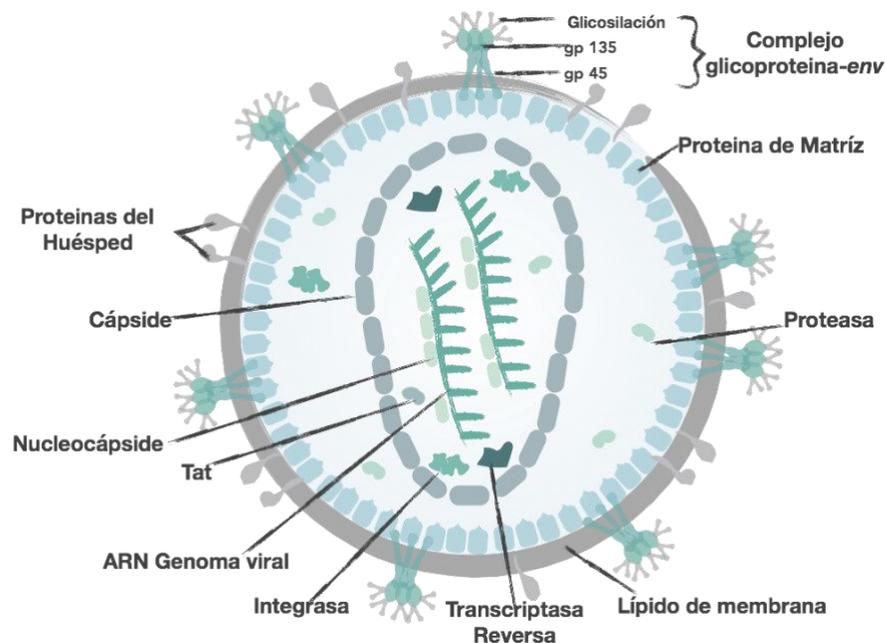


Figura 1: Representación esquemática de los LVPR (modificado)<sup>34</sup>

### 1.4.1 GENES

El genoma de los LVPR consiste de tres genes estructurales (*gag*, *pol*, *env*)<sup>35</sup>. El gen *gag* codifica la proteína precursora de Gag (Pr55gag), la cual se escinde en 3 proteínas: cápside (CA; p25), nucleocápside (NC; p14) y matriz (MA; p16). Durante la infección, la proteína de CA provoca una fuerte respuesta de anticuerpos que es importante para el diagnóstico. Dentro del núcleo de la proteína de CA, el genoma de ARN está conectado a proteínas de la NC. La proteína de MA se localiza entre la envoltura viral y el núcleo de la proteína de CA<sup>17, 18</sup>.

El gen *pol* codifica para las siguientes enzimas:

- Transcriptasa reversa (RT), enzima clave de los retrovirus, es una ADN polimerasa dependiente de ARN que permite la transcripción del ARN viral en ADN<sup>37</sup>.
- dUTPasa: la actividad de la dUTPasa asociada al virión es eficaz en la prevención de la incorporación de dUTP a TTP y por lo tanto minimizan la incorporación de residuos de uracilo en el ADN. La dUTPasa viral favorece la replicación en células que no se dividen como lo hacen los macrófagos, ya que los niveles de dUTPasa endógena y el grupo de desoxinucleótidos en estas células son bajos<sup>36</sup>.
- Integrasa (IN): la cual lleva a cabo la integración del ADN retroviral al genoma de la célula huésped. La IN se relaciona en los extremos de las LTR, que juntos forman el sitio de unión (ATT); la integración se produce por un mecanismo de procesamiento de extremo 3' del virus y unión de extremo 3' del huésped o transferencia de cadena<sup>38</sup>.

Proteasa (PR): la actividad de la PR viral es escindir los precursores de la poliproteína Gag y Gag-Pol para generar proteínas Gag y Pol maduras<sup>36,37</sup>.

Por su parte, el gen *env* codifica para las proteínas de envoltura o de superficie (SU) y transmembranal (TM)<sup>39</sup>.

- La proteína SU (gp 135) es una la glicoproteína de superficie hidrofílica, la cual está unida no covalentemente a la TM. La glicoproteína de la envoltura contiene los

epítomos responsables de la entrada a la célula como consecuencia de la interacción del virus con el receptor de la célula huésped, además de inducir la generación de anticuerpos neutralizantes<sup>17, 19</sup>. La respuesta inmune del hospedador estimula la variación antigénica de la proteína de SU necesaria para la viabilidad del virus y la cual confiere las propiedades biológicas y serológicas de los distintos aislados<sup>29</sup>.

- TM (gp 45): la glicoproteína hidrofóbica de transmembrana que se encuentra anclada en la doble capa lipídica de la envoltura ligada a la gp 135<sup>29</sup>.

Los LVPR además cuentan con tres genes regulatorios (*vpr-like*, *vif* y *rev*).

El gen *rev* regula la expresión de los genes estructurales al transportar los ARN mensajeros del núcleo al citoplasma; *vpr-like* tiene una función similar al gen *vpr* del virus de inmunodeficiencia humana, produciendo un arresto en la fase G2 del ciclo celular<sup>40</sup>. El gen *vif*, o factor de infectividad viral, es necesario para la replicación en el caso del VIH-2, VIS, VIF y LVPR evitando la incorporación en las partículas virales del factor de restricción celular APOBEC3 (A3)<sup>10</sup>.

Por último, el genoma está flanqueado por genes no codificantes denominados repeticiones de terminación largas o LTR por sus siglas en inglés, cuyas funciones son promover la transcripción del ARN mensajero viral, además de servir como señal de poliadenilación y terminación<sup>35</sup>.

#### **1.4.2 GENOTIPOS**

El análisis filogenético de varios aislados de LVPR ha documentado la existencia de 5 diferentes genotipos (A-E) y varios subtipos (figura 2) basados en el gen *gag* y *pol*<sup>41</sup>. Secuencias virales parciales identificadas en América, Europa y Asia han descrito que los tipos B, C y D y algunos subtipos A (A1, A3, A4, A5, A6, A9, A11, A12 y A13) infectan a ovinos y caprinos, mientras que otros subtipos sólo se han notificado en ovinos,

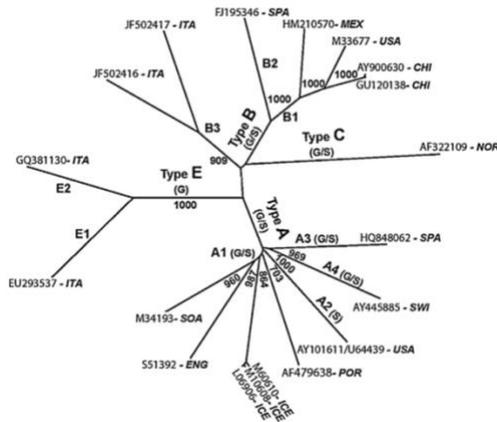


Figura 2: Árbol filogenético generado a partir de secuencias completas de LVPR que ilustran los principales genotipos (A-E) y subtipos (número de acceso de aislamiento y país de origen, CHI: China, ENG: Inglaterra, ICE: Islandia, ITA, Italia, MEX: México, NOR: Noruega, POR: Portugal, SOA: Sudáfrica, SPA: España, SWI: Suiza y USA: Estados Unidos de América)<sup>13</sup>

como el subtipo A15 o en cabras como los subtipos A7, A8, A10, A14, E1, E2 (figura 2, 3 y cuadro 1)<sup>13</sup>. No obstante, a medida que se obtienen más secuencias virales, estos "subtipos de una sola especie" tienden a desaparecer, infectando por igual a ovinos y caprinos<sup>35</sup>.

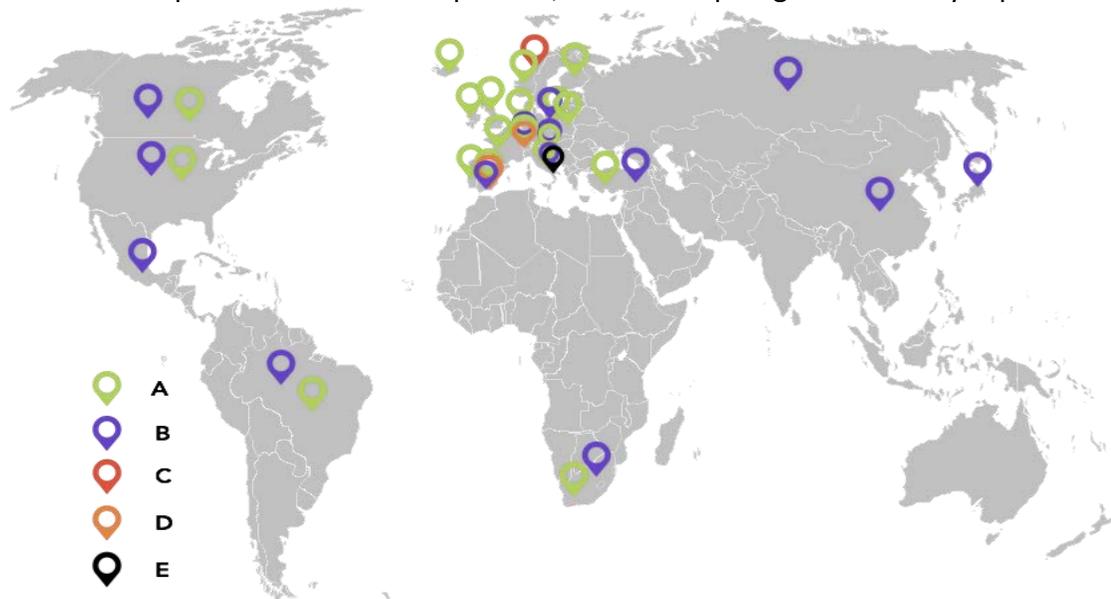


Figura 3: Distribución de genotipos de LVPR de cabras y borregos en diferentes países; genotipo A y genotipo B están distribuidos de la siguiente manera: Brasil B1 (caprinos); Canadá B1 (caprinos); China B1 (caprinos); Francia B1y B2 (ovinos y caprinos); Italia B1, B2 y B3 (ovinos y caprinos); Japón B1 (caprinos); México B1 (ovinos y caprinos); Polonia B1 y B2 (ovinos y caprinos); Rusia B1 (caprinos); Eslovenia (caprinos); Corea del Sur B1 (caprinos); España B2 (ovinos); Suiza B1 y B2 (ovinos y caprinos); Turquía B3 (caprino); EUA B1 (ovinos y caprinos). Genotipo C en Noruega (ovinos y caprinos). Genotipo D reportado solo en España (ovinos y caprinos) y Suiza (ovinos). Genotipo E1 y E2 reportadas sólo en Italia (cabras).

Cuadro 1: Distribución de subtipos del genotipo A por país y especie.

PAÍS	GENOTIPO A														
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
Brasil	C/O														
Canadá		O													
Inglaterra	O														
Finlandia	O	O													
Francia	O					C/O									
Grecia					O										
Islandia	O														
Irlanda	C														
Italia	C							C	C/O	C	C/O				
Holanda	O														
Noruega	O														
Polonia	C/O											C/O	C/O		
Portugal	O														
Eslovenia					O									C	O
África del Sur	O														
España	O		O												
Suiza	O		C/O	C/O	C	C/O	C								
Turquía		O	O		O				O		O				
EUA		O													

C: Caprinos; O : Ovinos<sup>35</sup>.

#### 1.4.3 CICLO DE REPLICACIÓN

El ciclo de replicación (figura 4) inicia desde la interacción de la glicoproteína de superficie del virión con receptores específicos en la superficie de la célula diana; se han realizado estudios en ovejas naturalmente infectadas con LVPR y clínicamente afectadas en las cuales se identificó un incremento en la expresión del receptor de manosa<sup>42</sup>. Sin embargo, otros autores han demostrado que los LVPR pueden penetrar en muchos tipos de células

diferentes de ovinos y en células de otras especies<sup>43</sup>. A diferencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en el cual están definidos los co-receptores que ayudan a la entrada del virus que es mediada por la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, esta información se desconoce en los LVPR<sup>36</sup>.

El genoma del ARN viral entra al citoplasma como parte de un complejo de nucleoproteínas, llamado complejo de transcripción inversa (CTI), el cual se compone del ARN viral y las proteínas víricas: RT, IN, NC, Vpr y algunas proteínas de la matriz<sup>36</sup>. La síntesis de ADN retroviral depende de dos actividades enzimáticas distintas de la proteína RT: la ADN polimerasa que puede usar ARN o ADN como molde, y la ribonucleasa H (RNasa H) que degrada el ARN del dúplex ARN-ADN. La transcripción inversa se inicia por unión del ARN de transferencia-lisina (tRNA<sub>lys</sub>) al sitio de unión adyacente a la U5, cerca del extremo 5' del ARN viral<sup>36</sup>.

1.4.3.1 TRANSPORTE AL NÚCLEO: el ADN bicatenario lineal se transporta al núcleo como un complejo de pre-integración (CPI) a través del poro nuclear; no se conoce completamente<sup>36</sup>.

1.4.3.2 INTEGRACIÓN: la integración se produce por un mecanismo preciso el cual se divide en dos etapas: procesamiento del extremo 3' y unión del extremo 3' o transferencia de cadena. En la reacción de procesamiento, la integrasa elimina el dinucleótido terminal GT de cada una de las LTRs, dejando una CA con un grupo hidroxilo 3' libre y una 5'-AC sobresaliente en la cadena complementaria, las cuales se pierden antes de la integración. Estos grupos hidroxilo 3' atacan los enlaces fosfodiéster en cada hebra de ADN diana<sup>36,38</sup> y en la reacción de transferencia de la cadena; la integrasa divide el ADN diana ligando ambos extremos 3' del ADN viral a los extremos 5' del ADN diana segmentado<sup>36,38</sup>. La integrasa también lleva a cabo una tercera reacción (desintegración), que es inversa a la reacción de transferencia de la cadena en la que un sustrato que imita un extremo del ADN viral unido al ADN diana se escinde en sus dos partes, el ADN viral y diana<sup>38</sup>.

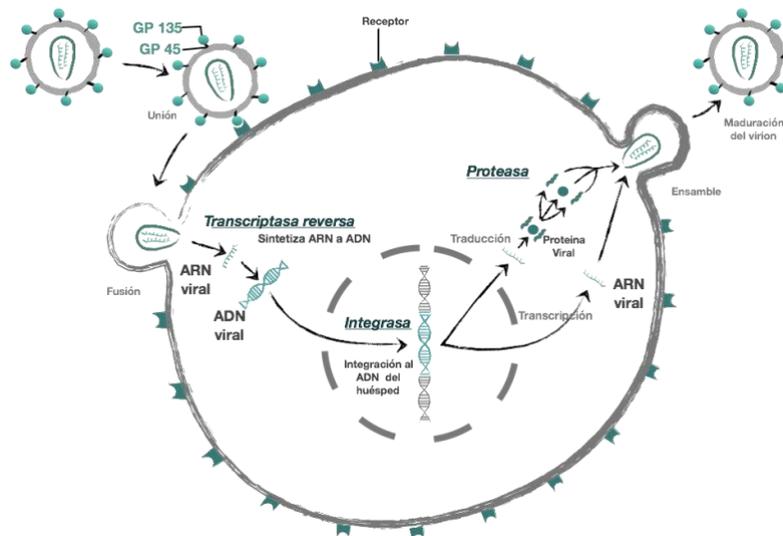


Figura 4: Ciclo de replicación de retrovirus, modificado<sup>34</sup>

1.4.3.3. TRANSCRIPCIÓN: el virus depende de la maquinaria de transcripción de la célula huésped, en la que los factores de transcripción se unen a la LTR una vez integrado el ADN viral (provirus). La transcripción se divide en dos fases. En la primera fase, se producen niveles bajos de ARNm de la proteína Rev. Se requiere un cierto nivel de Rev para pasar de la fase temprana a la fase tardía de la replicación viral. En la fase dos, se producen otras proteínas virales y copias del genoma<sup>36</sup>. Los lentivirus contienen al menos cinco especies de ARNm, el ARN genómico de longitud completa sirve como ARNm para las poliproteínas codificadas por *gag* y *pol*. Un evento de corte y empalme elimina los genes *gag* y *pol*, dejando una porción del genoma que sirve como ARNm para la proteína de la envoltura y el producto de al menos uno de los pequeños ORFs entre *pol* y *env*. Los ARNm más pequeños producidos por eventos de corte y empalme múltiples contienen las regiones codificantes para las proteínas reguladoras<sup>44</sup>.

1.4.3.4. TRADUCCIÓN: la traducción del ARNm produce el precursor de la proteína Pr55gag y 5-10% del ARNm se traduce en poliproteína Pr160gag-pol, el cual asegura la expresión de las proteínas Pol: RT, PR, dUTPasa e IN. Las proteínas de envoltura son glicosiladas e insertadas en el lumen del retículo endoplásmico (RE). Después de la traducción, los

monómeros de glicoproteína forman oligómeros para el transporte desde el RE al sistema Golgi. En el Golgi, la glicoproteína es escindida por una proteasa de la célula huésped en dos subunidades proteicas: glicoproteína de superficie (SU) y glicoproteína transmembranal (TM)<sup>36</sup>.

1.4.3.5. ENSAMBLE: estudios demuestran dos vías de ensamblaje de los lentivirus, por unión concomitante en la membrana plasmática de las células infectadas, y la segunda en vesículas intracelulares rodeadas de membrana. El pr55gag dirige el ensamblaje, gemación y liberación de partículas maduras de la membrana plasmática de la célula huésped. El N-terminal del dominio de la proteína de MA de la poliproteína es responsable del anclaje y es co-traducionalmente modificado en su extremo N-terminal por el ácido mirístico. Cuando la proteína Gag ha alcanzado la membrana plasmática, participa en interacciones Gag-Gag que permiten el ensamblaje del virus. El C-terminal de la proteína de CA es importante para la dimerización de las proteínas Gag. No se entiende completamente cómo se incorporan las glicoproteínas de Env en los viriones, pero parece que la cola citoplasmática de la proteína TM interactúa con el dominio de la proteína de MA de Gag (figura 5)<sup>27, 31</sup>.

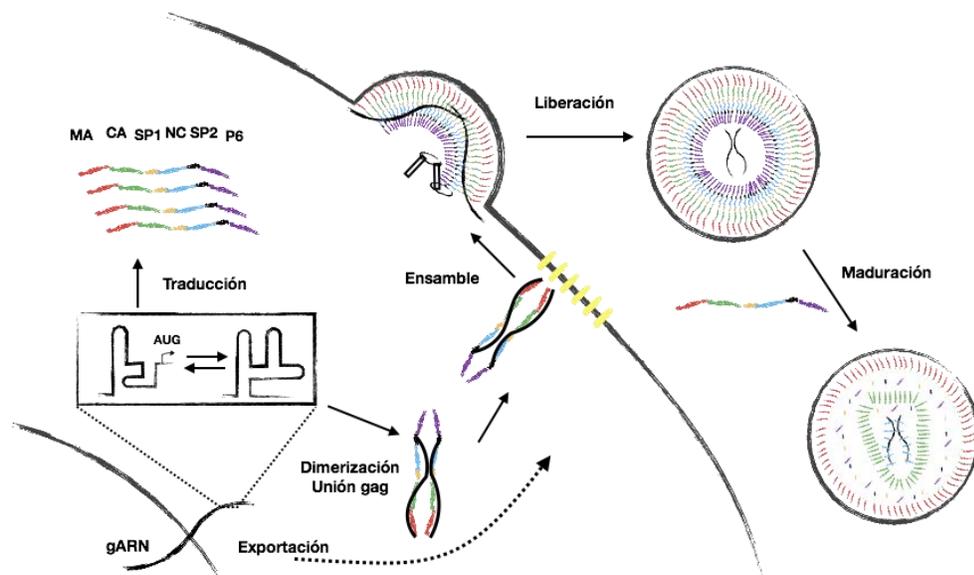


Figura 5: Ruta de ensamblaje, liberación y maduración del virus de VIH. (Modificado) de <sup>47</sup>

1.4.3.6. LIBERACIÓN: después del ensamble, el virión se libera de la membrana plasmática de la célula huésped. Un dominio tardío parece estimular la liberación del virus de la célula huésped. Se sabe que el VIH-1 utiliza un complejo de exportación endosomal (ESCRT-por sus siglas en inglés) que es parte de la maquinaria del huésped para gemar de la membrana plasmática. El ESCRT se compone de cuatro complejos de proteínas (ESCRT 0-III) implicados en la formación de cuerpos multivesiculares celulares y citocinesis (figura 5)<sup>36,47</sup>.

1.4.3.7. MADURACIÓN: la poliproteína Gag sufre una serie de cortes por la PR viral que conduce a la maduración del virus, la cual es esencial para la infectividad del mismo. La PR viral escinde los precursores de la poliproteína Gag y Gag-Pol para generar proteínas Gag y Pol maduras. La cápside viral no obtiene su forma correcta hasta después de brotar de la membrana celular. La maduración suele tener lugar en la membrana plasmática; la interrupción de cualquiera de las etapas de escisión mediante mutagénesis o agentes farmacológicos produce viriones no viables con morfologías núcleo anormal. El paso final de la escisión, es decir, la eliminación del péptido espaciador (SP1) de la CA, es particularmente importante, ya que desencadena la dramática reordenación estructural del núcleo desde una morfología esférica a cónica (figura 5)<sup>18,33</sup>.

## 1.5 VARIABILIDAD GENÉTICA

Esta variabilidad ha dado lugar a diferentes genotipos de LVPR capaces de infectar un amplio rango de hospedadores, tales como ovejas, cabras y algunos rumiantes silvestres. A pesar de la alta tasa de evolución de los lentivirus, muchos elementos en el genoma lentiviral se conservan a lo largo del tiempo como los genes *gag*, *pol* y ciertas partes del gen *env* están conservados, las zonas altamente variables principalmente son las regiones que codifican los sitios donde se unen los anticuerpos<sup>10,35</sup>. Existe una elevada frecuencia de recombinación entre genomas de retrovirus en células doblemente infectadas, dando lugar a las llamadas *cuasiespecies*, las cuales se definen como una población de variantes

antigénicas, entre las cuales sólo predomina una <sup>35,49</sup>. Su presencia se atribuye a que la polimerasa del ARN tiene altos porcentajes de errores y carece de mecanismos de corrección; esto influye directamente en el tamaño y en la integridad de la *cuasiespecie*, teniendo como resultado una gran heterogeneidad genética. El tipo de virus que originalmente infecta a la célula (conocido también como virus fundador) persiste en el animal, en coexistencia con las nuevas variantes o *cuasiespecies*. Este mecanismo de variabilidad no es sólo un instrumento para generar diversidad antigénica del virus y así evadir la respuesta inmune del hospedador, sino que también puede estar involucrado entre las infecciones cruzadas<sup>50,51</sup>.

Las mutaciones dan lugar a la selección natural, la cual es utilizada por los lentivirus para evadir la respuesta inmune. La mayoría de las mutaciones de LVPR se introducen en la etapa de transcripción inversa del ciclo de vida viral y se atribuye a la enzima transcriptasa inversa (RT), debido a la falta de la capacidad de reparación genera una tasa de error alta (0,2-2 mutaciones por genoma por ciclo)<sup>35,52</sup>. Las subpoblaciones de las variantes virales de *cuasiespecies* que fueron dominantes en etapa temprana durante el linaje evolutivo de un virus también puede influir en la evolución posterior de la población de *cuasiespecies*<sup>53</sup>.

Otros estudios en VIH encontraron que la hipermutación del genoma viral, donde hasta el 40% de las bases de guanina disponibles están sustituidas por adeninas, son atribuibles a la APOBEC, la cual se empaqueta en los viriones y se asocian con el complejo de transcripción inversa en la célula diana, donde desaminan los residuos de citosina en uracilo en la cadena de ADN monocatenario (-), lo que conduce a la mutación G a A en la cadena (+). La desaminación no ocurre aleatoriamente, ya que depende de que APOBEC sea es la preferencia de dinucleótidos<sup>10,54</sup>.

Es poco probable que la mutación por sí sola explique la flexibilidad adaptativa de los lentivirus. La recombinación puede ocurrir con frecuencia en el genoma viral, como se muestra en el gen *env* de la cepa MVV 1514 in vitro e in vivo. Este mecanismo de

diversificación genética puede mezclar eficazmente mutaciones dentro de una cuasi especie; puede ensamblar rápidamente combinaciones genéticas beneficiosas que serían difíciles de generar solo por mutación; y también puede eliminar eficazmente mutaciones deletéreas. En contraste con los cambios lentos y constantes causados por la mutación, la recombinación es una fuerza evolutiva mucho más poderosa<sup>55,56</sup>.

## 1.6 TROPISMO

El tropismo de LVPR está relacionado tanto con la genética del hospedador como con la heterogeneidad del genoma vírico, y puede estudiarse de acuerdo con las diferencias en los objetivos abordados con respecto a: (a) especies hospedadoras (cabras u ovejas, o ambas); (b) tejido, que difiere según la forma de la enfermedad (mastitis, artritis, encefalitis y / o neumonía); y (c) tipo de célula.

1.6.1 ESPECIE HUÉSPED: originalmente se consideraba que los VMV y VAEC, tales como las cepas K1514, EV-1, SA-OMVV y Cork-CAEV, infectaban sólo a la especie de donde fueron aisladas. Sin embargo, en las últimas dos décadas, la disponibilidad de un mayor número de secuencias de LVPR para análisis filogenéticos ha aumentado; estos han evidenciado que los LVPR pueden cruzar la barrera entre especies. Los estudios de epidemiología molecular sugieren que los LVPR pueden transmitirse entre borregos y cabras bajo condiciones naturales<sup>36,44</sup>. En los últimos años se han descrito brotes en ovinos y caprinos relacionados a genotipos diferentes a los previamente descritos, como el que sucedió entre el 2005-2007 en borregos de Aragón, España, donde se afectaron 274,048 borregos con artritis y se identificó al virus infectante como un genotipo B2<sup>57</sup>. Por otro lado, se describió un brote de tipo nervioso en Castilla y León, España, identificando al virus en el genotipo A3<sup>58</sup>.

1.6.2 TIPO CELULAR: los miembros del género lentivirus difieren en el tropismo celular y desarrollo de enfermedad. Éstos se distribuyen en dos grupos, el primero incluyen a el VIH, VIF y VIS, los cuales se replican en macrófagos y linfocitos causando un síndrome de inmunodeficiencia; el segundo grupo incluye al virus de anemia infecciosa equina y los LVPR, los cuales se replican principalmente en macrófagos<sup>35</sup>.

1.6.3 TIPO DE TEJIDO: difiere de acuerdo al desarrollo del cuadro clínico (mastitis, artritis, encefalitis y neumonía)<sup>35</sup>. Se han generado estudios que indican una tendencia a conservar aminoácidos en posiciones específicas en ciertas proteínas virales (que forman asas o bucles) llamados patrones firma “signature patterns”<sup>16, 45</sup>. Estos patrones se han podido asociar con patrones genéticos virales y determinados cuadros clínicos<sup>59</sup>. La región genética más importante asociada a la presentación de patrones firma es el gen *env*, ya que en él radica la expresión de la proteína de envoltura (SU) la cual está involucrada en la entrada viral a la célula<sup>35</sup>. Se ha propuesto que la región variable de la proteína SU V4 de los LVPR puede tener una función análoga a la V3 de VIH-1<sup>60</sup>. La identificación de los sitios de variación es potencialmente útil para identificar las mutaciones en estos sitios, que pueden determinar cambios fenotípicos en la asa V4 y lo cual puede correlacionarse con diferentes grados de patogenicidad de los virus<sup>59</sup>.

Además, se sabe que los macrófagos tienen grupos dNTP intracelulares desequilibrados, con un exceso de dUTP (uracilo). U es una base natural en el ARN, pero normalmente no se encuentra en el ADN. Sin embargo, puede incorporarse en el ADN debido a la incapacidad de RT para distinguir entre dTTP y dUTP. En lentivirus macrófagos-trópicos como LVPR codifican una desoxi-uridina 5'-trifosfato nucleótido-hidrolisasa (dUTPasa), que cataliza la conversión de dUTP en dUMP, manteniendo un nivel bajo para evita la incorporación errónea de dUTP por la RT, los virus recombinantes defectuosos dUTPase tienen una replicación menos eficiente en macrófagos y células de fibroblastos <sup>61-63</sup>.

## 1.7 PATRONES FIRMA EN OTROS VIRUS

### 1.7.1 VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

La glicoproteína de SU (gp 120) del VIH está compuesta por 5 regiones variables (V1 a V5) y 5 regiones constantes (C1 a C5) que tienden a ser similares entre los diferentes aislamientos víricos<sup>64</sup>. Las regiones V1 y V2 se encuentran unidas por puentes de disulfuro y forman el dominio V1/V2; las otras 3 regiones (V3, V4 y V5) forman asas independientes dentro de la gp 120. Las regiones constantes C1 a C5 presentan 15 sitios de glicosilación (figura 7). En las regiones variables se encuentran 9 sitios de glicosilación: 3 en la región V1; 2 en la región V2; uno en la región V3; 2 en la región V4 y finalmente uno en la región V5<sup>65</sup>.

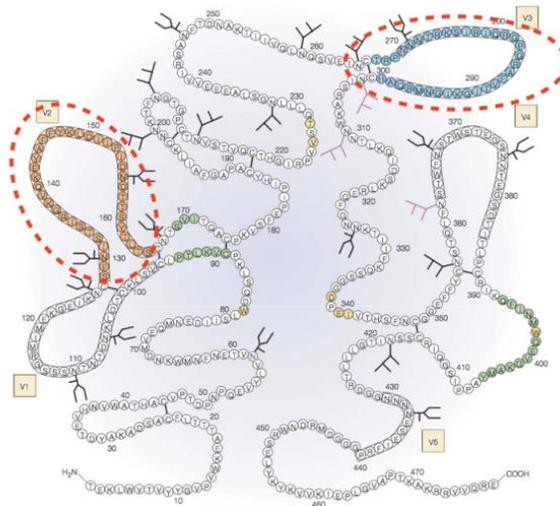


Figura 6: Estructura de la glicoproteína 120 VIH. Se observan las regiones variables (V1-V5) delimitadas por la sombra gris y las regiones conservadas (C1-C5), igualmente que los sitios de glicosilación. En el diagrama se observan las 5 regiones que contienen residuos de azúcares N en forma de rama. Los epitopes que inducen anticuerpos neutralizantes están marcados con líneas discontinuas. En el caso del dominio V1/V2, estos epitopes están ubicados en la región V2<sup>66</sup>.

La región variable tres (V3) de la gp 120 de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 está compuesto de 35 a 39 aminoácidos, los cuales forman un bucle que sobresale en el dominio exterior de la gp 120, es rico en aminoácidos básicos y tiene aminoácidos aromáticos para la interacción de apilamiento aromático con proteínas<sup>67</sup>. Existen estudios por Better y cols. (1994) donde hallaron patrones firma en la región V3 de

VIH, en secuencias derivadas de tejido cerebral, este patrón firma estuvo preservado también entre los aislados *in vitro* previamente caracterizados como macrofagotrópicos<sup>59</sup>. La V3 se caracteriza por una alta inmunogenicidad y por su especificidad de anticuerpos<sup>66</sup>.

#### 1.7.2 VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA Y VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA DEL SIMIO

Algunos estudios realizados con el virus de inmunodeficiencia felina (VIF) han descrito cambios en secuencias del gen *env* en la región V3 y V4 altamente variables, que fueron asociados al neurotropismo y neurovirulencia, ya que estas regiones poseen determinantes involucradas en el tropismo hacia macrófagos y efectos relacionados con neurotoxicidad<sup>68</sup>. Por otro lado, los patrones de secuencias encontrados en la región V4 del virus de inmunodeficiencia del simio (VIS), junto con la tasa de sustitución de nucleótidos sinónimos (dS) y no sinónimos (dN) han sugerido selección positiva del virus en diferentes regiones del cerebro<sup>69</sup>.

#### 1.7.3 VIRUS DEL DISTEMPER CANINO (VDC)

Los experimentos realizados han demostrado que la proteína hemaglutinina (HN) es la más variable, lo que podría explicar por qué el VDC tiene una gama de huéspedes más amplio en comparación con otros morbillivirus. El genotipo de dos virus del moquillo canino cepas ZJJ-SD y ZJJ-LN, se han investigado, los estudios se han basado en el gen de la hemaglutinina, al realizar el análisis se observaron sustituciones de aminoácidos en las posiciones 530 y 549 de la proteína HN<sup>70</sup>. Los análisis filogenéticos de las secuencias de las cepas del VDC de perros domésticos y especies no perros indicaron que la selección positiva conduce a las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 530 y 549 dentro de la región de unión a SLAM (por sus siglas en inglés “cell receptor signaling lymphocytic activation molecule”) del gen HN. Seis aminoácidos diferentes [ácido aspártico (*D*), ácido glutámico (*E*), glicina (*G*), asparagina (*N*), arginina (*R*) y serina (*S*)] se observaron en el sitio 530, la mayoría de las cepas

del VDC recuperada de los perros domésticos tenían 530G o 530E. Sin embargo, las cepas de carnívoros no perro terrestres y una cepa de un carnívoro acuático tenían los aminoácidos *R*, *D*, y *N*<sup>70</sup>. En los diferentes huéspedes, las cepas del VCD de los perros domésticos mostraron tirosina (*Y*) en el sitio 549. Sin embargo, 7 de cada 12 cepas procedentes de hospedadores no perro codificaron histidina (*H*) en el sitio 549. Análisis de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones funcionales conocidas 530 y 549 dentro de la región de unión a SLAM del gen HA indicó que las diferencias significativas entre la prevalencia de 549Y y 549H en canino salvaje y la cepas no caninas sugirieron un grado de adaptación del virus a la categorías de las especies de acogida<sup>70</sup>.

#### 1.7.4 VIRUS DE NEWCASTLE (VDN)

El VDN vicerotrópico velógeno es altamente patógeno y provoca infección intestinal con alta mortalidad, mientras que el VDN velógeno neurotrópico es responsable de los signos respiratorios y nerviosos con alta mortalidad. Las cepas mesogénicas son relativamente menos patógenas, a menudo con signos respiratorios y nerviosos agudos pero con una mortalidad relativamente baja<sup>71</sup>.

Las cepas lentogénicas de VDN causan infecciones respiratorias leves, es una forma entérica subclínica en la que el huésped vive más tiempo. Esta diferencia en la patogenicidad se debe principalmente a diferencias en el sitio de escisión dentro de la proteína F. Esta proteína se sintetiza como un precursor (F0) en estado no funcional, que luego se escinde por proteasas del huésped en dos polipéptidos funcionalmente activos (F1 y F2). Todas las cepas mesogénicas y velogénicas de VDN llevan una secuencia de aminoácidos de 112 *R/K-R-Q-R/K-R-F*117 dentro de la proteína F mientras que los virus lentogénicos tienen 112 *G/E-K/R-Q-G/E -R-L*117<sup>68, 69</sup>.

## 1.8 MODELADO DE PROTEÍNA

### 1.8.1 ESTRUCTURA Y CONFORMACIÓN DE ASAS

Los “loops” son segmentos aperiódicos en la estructura secundaria de la proteína, que generalmente se encuentran en la superficie de la misma. Las estructuras de bucle más cortas están bien caracterizadas e incluyen giros  $\beta$ , giros  $\alpha$ , giros  $\pi$  y tipo horquilla<sup>73</sup>. En un intento de distinguir entre estos, las definiciones originales restringieron el número de residuos en los bucles entre 6 y 16. La distancia entre los extremos terminales se limitó a menos de 10 Å y a menos de dos tercios el C - C a través del segmento de bucle<sup>73</sup>. Los bucles expuestos en la superficie juegan un papel crucial porque tienen el potencial de interactuar con solventes, ligandos y otras biomoléculas<sup>74</sup>. Estudios realizados en 680 cadenas de proteínas han identificado 1079 bucles y han podido establecer las posiciones específicas de los elementos de viraje, donde se han identificado la Glicina (G), Prolina (P), un residuo con  $\alpha$ helice,  $\phi$ ,  $\Psi$ , denominado residuo helicoidal y Cisteína (C)<sup>73</sup>.

La proteína de SU está involucrada con la unión al receptor celular, facilitando los primeros pasos en la interacción virus-célula, además de ayudar a la fusión entre las membranas viral y celular<sup>75</sup>. El gen *env* codifica para una poliproteína la cual es altamente glicosilada y forma la envoltura del virus. El gen *env* de todos los lentivirus contienen secuencias de aminoácidos R-X-K-R, estas secuencias representan los sitios de clivajes de la glicoproteínas de envoltura y membrana proteica externa (hidrofílica) y la porción hidrofóbica de transmembrana<sup>76</sup>. La glicoproteína de envoltura contiene algunos determinantes de importancia biológica como los que interaccionan con el receptor celular y la fusión inducida por el virus y los epítomos que inducen anticuerpos neutralizantes. La envoltura son residuos de carbohidratos altamente glicosilados y protegen al virus de las proteasas, reducen la afinidad de los anticuerpos neutralizantes para el virus y en algunos casos secuestran epítomos neutralizantes del sistema inmune<sup>44</sup>. Los epítomos del virus pueden



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios han identificado que dentro del asa V3 (altamente variable) de la proteína de envoltura (SU) del VIH tipo 1 (región homóloga a la V4 en LVPR), se encuentran patrones de secuencias (patrones firma o “signature patterns”) de aminoácidos conservados en diferentes posiciones de el asa (bucle), los cuales han sido asociados con patrones genéticos virales y con el desarrollo de cuadros clínicos específicos (tropismo específico a órganos). Es posible como sucede con el VIH y otros virus que el progreso o no al desarrollo de cuadros clínicos después de la infección por LVPR en ovinos y caprinos se ha debido a patrones firma en el asa V4 de los LVPR y los cuales estén relacionados a genotipos específicos.

## 3. HIPÓTESIS

Existe una relación entre los patrones firma en la región V4 de LVPR relacionados a cuadros clínicos específicos por especie. Estos patrones firma serán diferentes entre ovinos y caprinos con presencia de cuadro clínico y asintomáticos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la variabilidad de la región V4 del gen *env* de Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) en ovinos y caprinos infectados naturalmente, que desarrollen diferentes cuadros clínicos o se encuentren asintomáticos en diferentes rebaños del país.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar el LVPR en especies de caprinos y ovinos con pruebas serológicas (ELISAc), cuyos cuadros clínicos correspondan a fases clínicas de artritis, mastitis, respiratorios y asintomáticos y que haya sido infectados naturalmente por LVPR, de diferentes estados de la República Mexicana.
- Diseñar iniciadores específicos para la región V4 del gen *env* de LVPR y estandarizar la técnica de PCR para la detección del ADN proviral en LSP y tejidos y secuenciar los productos obtenidos.
- Analizar las secuencias de la región V4 de LVPR, mediante programas bioinformáticos a fin de para determinar la presencia de patrones firma, variabilidad genética y determinar los genotipos virales infectantes.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 ANIMALES DE ESTUDIOS

El diseño experimental del trabajo consideró dos especies ovinos y caprinos, de las cuales derivaron los siguientes grupos: animales con signos clínicos (artritis, mastitis y cuadro respiratorio), sin presencia de ellos y animales destinados al sacrificio. Se colectaron muestras de diferentes rebaños de ovinos y caprinos de forma no probabilística con productores cooperantes y de animales de rastro con autorización de los responsables. Los animales provinieron de diferentes regiones del país.

### 5.2 MUESTRAS

#### 5.2.1 TOMA DE MUESTRAS

De los animales del estudio se les obtuvo sangre completa por punción de la vena yugular utilizando tubos con anticoagulante (BD Vacutainer® con Heparina de Litio / Sodio, México) y aguja calibre 21 (Aguja BD, México). Se tomaron muestras de sangre de los animales con cuadro clínico aparente y sin él. En el caso de los animales con evidencia de cuadro clínico (artrítico, mastítico o respiratorio) que se destinaron al sacrificio y/o de rastro, se realizó la colección de tejidos (hígado, bazo, pulmón, glándula mamaria, riñón y membrana sinovial) los cuales se colocaron en RNA later™ (SIGMA,USA) a fin de estabilizar y preservar el material genético, hasta su extracción. De manera simultánea, se colectaron muestras de sangre, a partir de las cuales se obtuvo plasma y leucocitos de sangre periférica.

## 5.2.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

La sangre obtenida fue centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos para la separación de fases (plasma, capa blanca y glóbulos rojos); el plasma fue colectado en 4 tubos de 1.5mL y conservado a -70° C y la capa blanca fue obtenida mediante el uso de soluciones de lisis<sup>78</sup> (anexo 1), elaboradas en el laboratorio de “Virología, Genética y Biología Molecular” para obtener los leucocitos de sangre periférica (LSP) (apéndice 1).

## 5.3 IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES INFECTADOS POR LVPR

La infección por LVPR en los animales (ovinos y caprinos) fue evaluada con las muestras de plasma previamente colectadas y mediante una prueba comercial de ELISA competitiva (CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS VIRUS ANTIBODY TEST KIT, cELISA VMRD™, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

## 5.4 INICIADORES DE LAS PCR

### 5.4.1 DISEÑO DE INICIADORES DEL GEN *env* Y DE LA REGIÓN V4

El diseño de los iniciadores (cuadro 2) estuvo basado en las secuencias completas de LVPR disponibles en el GenBank: CHI – China (Gansu AY900630 y Shanxi GU120138.1)<sup>79</sup>; ESP – España (496 FJ195346, 697 HQ848062)<sup>72, 73</sup>; ENG – Inglaterra (EV1 S51392)<sup>82</sup>; ICE– Islandia (KV1514 M60610, LV1 y KV1772 L06906)<sup>83–85</sup>; ITA – Italia (Roccamare EU293537, Seui GQ381130, Forni JF502416 y Volterra JF502417)<sup>72, 73, 78</sup>; MEX – México (FESC-752 HM210570)<sup>7</sup>; NOR – Noruega (1GA AF322109)<sup>87</sup>; POR – Portugal (P1OLV AF479638)<sup>88</sup>; SOA – Sudáfrica (SA-OMVV M34193)<sup>89</sup>; SWI – Suiza (SRLV-A4 AY445885)<sup>51</sup> y USA – Estados Unidos (CAEV-CO M33677 y 85/34 AY101611, U64439). La finalidad de obtener diferentes secuencias de todos los genotipos, fue para que los iniciadores se hibridaran en una mayor

gama de genotipos. Una vez obtenidas las secuencias, se alinearon en el programa BioEdit para determinar las regiones de interés y las más conservadas para posteriormente determinar las posiciones adecuadas y/o determinar las bases a degenerar. Los iniciadores fueron diseñados con el programa Primer3 input en línea ([https://primer3plus.com/primer3web/primer3web\\_input.htm](https://primer3plus.com/primer3web/primer3web_input.htm)) en el cual se consideraron los siguientes parámetros: un tamaño de entre 18 y 25 nucleótidos, menos de 50% en el contenido de G-C y una temperatura de hibridación menor a 62°C.

Cuadro 2: Secuencias de los iniciadores utilizados en las PCR y producto de amplificación.

INICIADOR	SECUENCIA	PRODUCTO
<i>FW 3 env</i>	AGAGTATGGGTAAGAWTGGCAA	946pb
<i>RV 3a env</i>	CAGCCACTATTGCCATGAT	
<i>FW 4b (V4)</i>	AATTGGGATGGATGTAATTGC	398pb
<i>RV 3b (V4)</i>	TTGGTGCAGCATTCCATCTA	

#### 5.5 CONTROL POSITIVO DE PARA LA PCR DEL GEN *env* Y DE LA REGIÓN V4

Como control positivo para la estandarización de las técnica de PCR de *env* y de la región V4, se obtuvo cDNA a partir de RNA de sobrenadante de cultivos celulares de células de membrana sinovial de feto caprino (MSFC) infectados con cepa FES-752 de LVPR de un trabajo previo<sup>9</sup>. La extracción de ARN se llevó a cabo con el Kit RNeasy Mini Kit de Qiagen® (USA), una vez obtenido el ARN se cuantificó y se realizó el procedimiento para la obtención de cDNA con el SuperScript™ II Reverse Transcriptase Invitrogen (USA), utilizando un volumen final de 20 µl de la mezcla de reacción siguiendo las condiciones que se indican en el cuadro 2. Obteniendo así cDNA completo para utilizarse en cualquier PCR que amplifique alguna región genética de LVPR (cuadro 3).

## 5.6 EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó la extracción de ADN tanto de LSP y de los tejidos utilizando un kit comercial FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit™ (Taiwán), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado mediante la lectura de la absorbancia a 260-280 nm en un NanoDrop Lite (Thermo Scientific, USA). El ADN obtenido fue conservado a -70°C hasta su uso.

Cuadro 3: Reactivos y condiciones para la obtención del cDNA de LVPR cepa FES-752

Reactivo	Concentración	1 reacción
Random primer's	(250ng/μl)	1 μl
ARN total	1-5 μg	4 μl
dNTP's mix	10 mM	1 μl
H <sub>2</sub> O DEPC	NA	cbp 12 μl
65°C 5 minutos		
Buffer first stand	5x	4 μl
DTT	0.1 M	2 μl
RNAse OUT	40 U/μl	1 μl
25°C 2 minutos		
Super Script	200U	1 μl
25°C 10 minutos		
42°C 50 segundos		
70°C 15 minutos		

μg: microgramo, ng/μl: nanogramos por microlitro, mM: milimolar, cbp: cuanto baste para, U/μl: unidades por microlitro, dNTP's: mezcla de deoxinucleótidos, DTT: ditioneitol, DEPC: diethylpyrocarbonate, °C: grados Celsius, NA: no aplica.

## 5.7 DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL DE LVPR

Para la detección del genoma proviral, se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada que permite la detección de la región V4 del gen *env*, empleando como templado el ADN de los LSP y el ADN de los tejidos. Se llevó a cabo una primera reacción, utilizando los iniciadores FW 3-*env* y RV 3a-*env* obteniéndose un producto de amplificación de 946 pb. Este primer amplicon posteriormente, fue utilizado como molde en una dilución 1:20, para llevar a cabo una segunda reacción o propiamente la PCR anidada. De esta manera y empleando los iniciadores FW 4b (V4) y RV 3b (V4), se obtuvo el producto final de amplificación de 398 pb y que corresponde a la región V4 del gen *env*. Todas las PCR fueron estandarizadas con base a la amplificación del control positivo (cDNA FES-752) utilizando diferentes concentraciones de reactivos, ADN molde y Tm de los iniciadores, con lo cual se identificaron las mejores condiciones de amplificación de los productos.

### 5.7.1 PCR *env* (primera ronda)

Condiciones y reactivos de la primera ronda de PCR para el gen *env* se describe en el cuadro 4 y figura 8.

Cuadro 4: Reactivos de la mezcla de reacción de la PCR-*env* (primera ronda)

Reactivos	Concentración inicial	Vol. Por reacción (μl)
Agua GBM	NA	17.3
Buffer 10x con 1.5 Cl <sub>2</sub> Mg	1X	3.0
DNTP's	230 μM	0.7
Iniciador Fw3 LVPR	500 nM	1.5
Iniciador RV3a LVPR	500 nM	1.5
Taq	5u/μL	1.0
ADN	100 ng	5.0
Total		30.0

GBM: grado biología molecular, Cl<sub>2</sub>Mg: cloruro de magnesio, μg: microgramo, ng/μl: nanogramos por microlitro, mM: milimolar, nM: nanomolar, μM: micromolar, U/μl: unidades por microlitro, dNTP's: mezcla de deoxinucleotidos, Fw: forward, Rv: reverse, °C: grados Celsius, NA: no aplica.

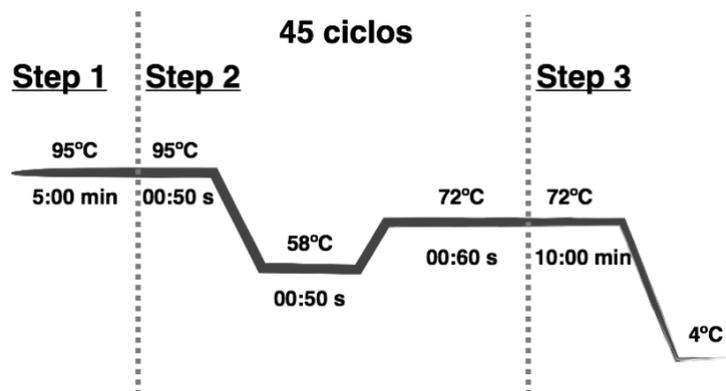


Figura 8: Condiciones de amplificación de la PCR *env*, primera ronda. °C: grados Celsius.

### 5.7.2 PCR-V4

La PCR para la amplificación de la región de interés V4 de LVPR, se realizó en un volumen de reacción de 30µl como se describe en el cuadro 5 y las condiciones en la figura 9.

Cuadro 5: Mezcla de reacción para la PCR-*env* (V4) anidada

Reactivos	Concentración inicial	Vol. Por reacción (µl)
Agua GBM	NA	17.3
Buffer 10x con 1.5 Cl <sub>2</sub> Mg	1X	3.0
DNTP's	230 µM	0.7
Iniciador Fw4 LVPR	500 nM	1.5
Iniciador Fw3b LVPR	500 nM	1.5
Taq	5u/µL	1.0
Producto de la PCR <i>env</i> 3 (1:10)	NA	5.0
Total		30.0

GBM: grado biología molecular, Cl<sub>2</sub>Mg: cloruro de magnesio, µg: microgramo, ng/µl: nanogramos por microlitro, mM: milimolar, nM: nanomolar, µM: micromolar, U/µl: unidades por microlitro, dNTP's: mezcla de deoxinucleotidos, Fw: forward, Rv: reverse, °C: grados Celsius, NA: no aplica.

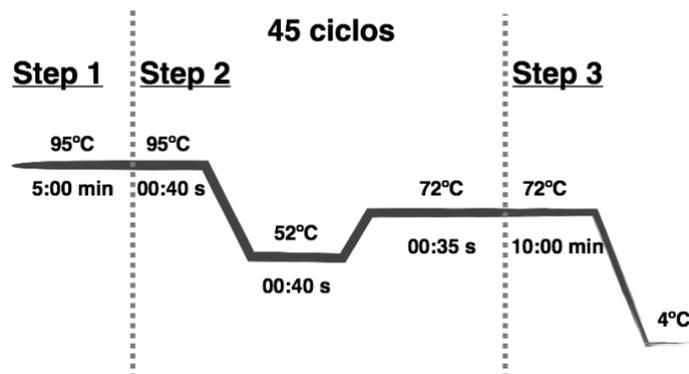


Figura 9: Condiciones de amplificación de la PCR-env V4.  
°C: grados Celsius.

### 5.7.3 PCR DEL GEN ENDÓGENO SUCCINATO DESHIDROGENASA (SDHA)

Para la valoración de muestras negativas a la PCR y corroborar la integridad del ADN, se utilizó un juego de iniciadores del gen endógeno constitutivo succinato deshidrogenasa (SDHA) FW-SDHA 5'-CATGGAGGAGGACAACACTG-3' y RV-SDHA 5'-TGGTAGATCTTCCCATCTTC-3' obteniendo un producto de amplificación de 348pb, los cuales fueron diseñados por el grupo de trabajo. Se estandarizó la PCR de un gen endógeno SDHA la cual se muestra en el cuadro 6 y figura 10.

Cuadro 6: Mezcla de reacción para la PCR del gen constitutivo SDHA

Reactivos	Concentración inicial	Vol. por reacción (µL)
Agua GBM	NA	16.4
Buffer 10x con 1.5 Cl <sub>2</sub> Mg	1X	2.5
dNTP's	230 µM	0.6
Iniciador Fw-SDHA	500 nM	1.25
Iniciador Rv-SDHA	500 nM	1.25
Taq	5u/µL	1.0
ADN	100 ng	2.0
Total	NA	25.0

GBM: grado biología molecular, Cl<sub>2</sub>Mg: cloruro de magnesio, µg: microgramo, ng/µl: nanogramos por microlitro, mM: milimolar, nM: nanomolar, µM: micromolar, U/µl: unidades por microlitro, dNTP's: mezcla de deoxinucleotidos, Fw: forward, Rv: reverse, °C: grados Celsius, NA: no aplica.

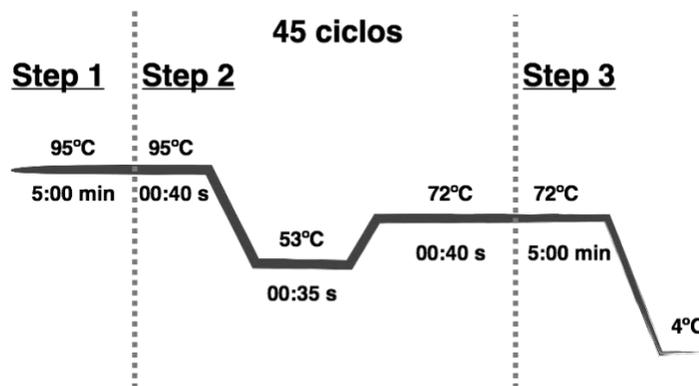


Figura 10: Las condiciones de amplificación para la PCR-SDHA. °C: grados Celsius

## 5.8 ELECTROFORESIS

Los productos de las PCRs se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X (anexo 1), aplicando corriente eléctrica a 110 volts por 1:15 hora y se tiñeron con bromuro de etidio (5µg/ml) para su posterior observación bajo la luz ultravioleta en un transiluminador (UVP, M-20E, USA). En las muestras positivas se observó una banda del tamaño esperado (ver cuadro 3). Las muestras positivas a la PCR-*env* V4 fueron cortadas y purificadas.

## 5.9 PURIFICACIÓN

La purificación de los productos esperados se realizó con ayuda de un kit comercial FavorPrep GEL/ PCR Purification Kit ® (Taiwán) siguiendo las indicaciones del fabricante.

## 5.10 SECUENCIACIÓN, ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y EDICIÓN DE SECUENCIAS

Los productos de PCR se purificaron y se enviaron para su secuenciación nucleotídica automatizada a la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala, UNAM; empleando el equipo ABI 3130x1 (Genetic analyzer con 16 capilares, Applied Biosystems®).

La secuenciación se realizó con base en la cadena antisentido 3'- 5', utilizando el iniciador Rv3b. Las secuencias resultantes posteriormente, se analizaron empleando los programas bioinformáticos CHROMAS® y MySequence® 1.1.4. Un análisis comparativo de similitud e identidad entre las secuencias de la región V4 de LVRP se llevó a cabo con el programa. Finalmente, las secuencias fueron editadas y alineadas con los programas BioEdit® y **GENEIOUS®**.

#### 5.10.1 GENOTIPIFICACIÓN (ÁRBOLES FILOGENÉTICOS)

Para determinar el genotipo de cada secuencia se utilizaron programas bioinformática: **MEGA® v6.06** se utilizó para la elaboración de árboles filogenéticos por el método **Maximum Likelihood** con bootstrap de 1000 entre las secuencias obtenidas. **GENEIOUS®** para la construcción de árboles usando el algoritmo de **MrBAYES** el cual utiliza el modelo de Markov Monte Carlo (MCMC para aproximar las probabilidades posteriores de los árboles, utiliza el modelo no reversible 4x4 que es el más general para determinar sustituciones en el ADN. El programa también implementa varios métodos para aminorar la suposición de tasas iguales en todos los sitios, incluida la variación de la tasa de distribución<sup>90</sup>. Y como herramienta de edición y mejoramiento (imagen y diseño) en el árbol filogenético se utilizó FigTree® v1.4.3.

#### 5.10.2 VARIABILIDAD GENÉTICA (DISTANCIA GENÉTICA Y SUSTITUCIONES SINÓNIMAS Y NO SINÓNIMAS)

Para determinar la distancia genética entre las secuencias se utilizó el programa **GENEIOUS®**, este al realizar la construcción de árboles filogenéticos (**MrBAYES**) determina la distancia genética entre las secuencias analizadas.

Y como programa para determinar la mutación de las secuencias se utilizó el programa en línea (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/SNAP/SNAP.html>) SNAP v2.1.1 (Synonymous No-synonymous Analysis Program), el cual calcula la relación de la proporción entre la sustituciones sinónimas y no sinónimas ( $dN/dS$ ) es la medida más popular y confiables de las presiones evolutivas en las regiones que codifican proteínas. Gran parte de su popularidad proviene de la interpretación simple e intuitiva de  $dN / dS$  de 1 como selección negativa,  $dN / dS = 1$  como neutralidad y  $dN / dS$  menor a 1 como selección positiva. Sin embargo, esta interpretación simple requiere que las secuencias que se comparan representen muestras estereotípicas de poblaciones divergentes, una suposición que también está implícita en los métodos que estiman  $dN / dS$  por máxima verosimilitud<sup>91</sup>

### 5.10.3 PATRONES FIRMA Y ENTROPÍA

Programa en línea VESPA® (Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis) el cual se utiliza para analizar las secuencias y detectar patrones firma (aminoácidos atípicos o residuos de nucleótidos) en un conjunto de secuencias de consulta relativas a un conjunto de secuencias de fondo (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html>). VESPA calcula la frecuencia de cada aminoácido (o nucleótido) en cada posición (columna) en una alineación para las secuencias de consulta y el conjunto de secuencias de fondo y selecciona las posiciones para las cuales el carácter más común en el conjunto de consultas difiere de aquel en el conjunto de fondo. Este programa se puede utilizar para detectar rápidamente los aminoácidos que caracterizan las diferencias entre dos grupos de secuencias. Compara dos grupos de secuencias y busca un patrón "firma", o el conjunto de aminoácidos que se conserva entre cada conjunto, pero que difieren entre los conjuntos. Seleccionará los aminoácidos que lo distinguen y calculará sus frecuencias en cada conjunto<sup>92</sup>.

Para calcular la entropía entre las secuencias se utilizó el programa en línea de Shannon ENTROPY-TWO®(<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html>).

Esta herramienta aplica la entropía de Shannon como una medida de la variación en las alineaciones de la secuencia del ADN y de la proteína. ENTROPY-TWO compara dos conjuntos de secuencias alineadas (llamada secuencias de consulta y secuencias de fondo) y determina si existe una mayor variabilidad en un conjunto con relación al otro. Cada posición con una diferencia significativa en la variabilidad entre estos dos conjuntos se pondrá de relieve en contra de un consenso de consulta. Es una medida cuantitativa simple de la incertidumbre en un conjunto de datos. Una forma cualitativa de pensarlo en términos de secuencias es si se toma un conjunto de muestras de una población grande, la entropía de Shannon podría considerarse como una medida indicativa de su capacidad de adivinar qué aminoácidos serían en la siguiente secuencia que se tomó de la población, basado en el muestreo previo. Esta aplicación es potencialmente útil para situaciones en las que simplemente se está tratando de evaluar la diversidad de la población en un sentido transversal; para aplicaciones biológicas en las que es necesario comprender la presión selectiva en un sitio, se prefiere un método filogenético para evaluar medidas comparativas de las tasas de sustitución sinónima y no sinónima.

## 6. RESULTADOS

En el presente trabajo se consideraron muestras de sangre completa de 248 animales, 105 ovinos y 143 caprinos, de los cuales 17 presentaban cuadro artrítico (17 de Gto., 4 Edo. Méx., 2 Qro.), siendo 5 los reportados con mastitis (Edo. Méx.), 6 ambas artritis-mastitis (3 Gto. y 3 Edo. Méx.). Asimismo, 115 fueron asintomáticos de 8 estados (B.C.S, Coah., Edo. Méx., Gto., Qro., Sin., Son. Ver.) en el caso de caprinos, de los ovinos todos eran asintomáticos.

Los animales destinados al sacrificio fueron 7 caprinos (2 con artritis y 5 con artritis-mastitis) y 1 ovino asintomáticos procedentes del Edo. México, y 2 caprinos del Estado de Guanajuato donde solo 1 presentaba un cuadro respiratorio.

### 6.1 SEROLOGÍA

Los resultados serológicos de las muestras obtenidas fueron: 84 asintomático, 23 con cuadro artrítico, 5 con mastitis, 6 con artritis-mastitis en el caso de caprinos seropositivos (cuadro 13), y 104 asintomáticos seropositivos ovinos (cuadro 14). Los 3 Estados con mayor número de muestras seropositivas a LVPR en la técnica de ELISAc fueron= ovinos del Estado de México 25.4% (n=63), Hidalgo y B.C.S. 3.6% (n=9) y Sonora 5.6% (n=14); y de las muestras de caprinos los Estados de Guanajuato 13.7% (n=34), Sonora 7.7%(n=19) y Edo. México 6.5% (n=16) fueron los que tuvieron un mayor número de seropositivos (anexo I).

### 6.2 DETECCIÓN DE LA REGIÓN V4 DEL GEN *env*, MEDIANTE PCR

A partir de 248 muestras de ADN de leucocitos de sangre periférica de ovinos y caprinos evaluadas en la PCR-V4, se logró el producto de amplificación esperado en 94 muestras (figura 11). Los resultados positivos en la PCR-V4 en caprinos por Estado fueron: 2/5 de B.C.S., 10/18 de Coahuila, 13/16 del Estado de México, 16/34 de Guanajuato, 11/59 de

Querétaro, 5/8 de Sinaloa, 2/19 de Sonora y 8/30 de Veracruz (cuadro 8). A partir de 7 cabras destinadas al sacrificio provenientes del Estado de México y 2 del Estado de Guanajuato, de estos animales se colectaron muestras de bazo, glándula mamaria, hígado, membrana sinovial, pulmón y riñón, siendo un total de 58 muestras colectadas y de las cuales solo 37 del Estado de México y 3 de Guanajuato fueron positivas a la PCR-V4 (cuadro 7). Por otra parte, los resultados positivos obtenidos en el ADN de LSP de ovinos con la PCR-V4 por Estado fueron: 17/63 del Estado de México, 7/38 de Hidalgo, 2/14 de Sonora y 1/21 de Veracruz (cuadro 9). En el caso de los ovinos destinados al sacrificio se muestrearon 30 y solo 2 animales fueron reactivos a la técnica de ELISA competitiva comercial, los cuales fueron evaluados a la PCR-V4 resultando positivo solo el bazo en un animal (cuadro 7). En la figura 16 se muestran ejemplos de los productos de amplificación de 389pb de algunas muestras evaluadas en la PCR-V4 tomando como referencia el marcador de pares de bases (MPB).

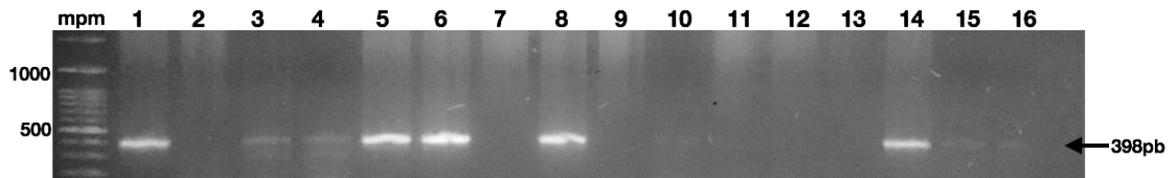


Figura 11: Análisis electroforético en geles de agarosa al 1.5% de los producto amplificados de la PCR-V4 esperado de 398pb, MPM: marcador de pares de bases; 1) control positivo; 2, 3, 4, 6-9, 11 y 12) muestra 1148, 01128, 9353, 9321, 9339, 9201, 9228, 8253 y 8983 de LSP ovino del Edo. Méx; 5, 10) muestra 495049, SN6, LSP ovino de Ver.; 13-16) muestra CR107, CR194, CR189 y 9244 de LSP ovino de Edo. Méx.; 17) muestra Control Negativo de Amplificación (CNA).

Cuadro 7: Muestras de tejidos evaluadas por PCR-V4 para la detección de ADN proviral de LVPR.

ID	CUADRO	LSP	HDO	BZO	RÑO	PLM	G.M.	M.S.
59	A	+	-	+	-	+	+	+
104		+	-	+	-	+	+	+
149	AM	+	+	+	+	+	+	-
179		+	+	+	+	+	+	+
78		+	-	+	+	-	+	+
342		+	-	+	+	+	+	+
10		+	-	+	+	-	+	+
5666	R	+	-	+	-	-	+	+
1	Ssx	-	-	-	-	-	-	-
22*	Ssx	-	-	-	+	-	-	-

ID: Identificación, AM: artritis-mastitis; A: artritis; PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, LSP: Leucocitos de sangre periférica, HDO: Hígado, BZO: Bazo, RÑO: Riñón, PLM: pulmón, G.M.: Glándula mamaria, M.S.: Membrana sinovial, SM: Sin muestra, 22\*: Muestras de ovino.

### 6.3 PCR SDHA

El ADN derivado de animales con resultados negativos a la PCR-V4 se les realizó la detección por PCR de un fragmento del gen constitutivo SDHA, para verificar la integridad del ADN y corroborar que fueran realmente negativos a la PCR; las muestras positivas mostraron un producto de amplificación de 386 pb (figura 12).

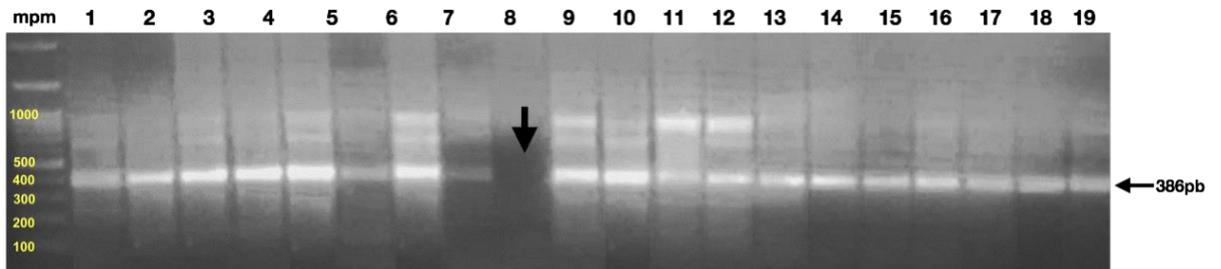


Figura 12: Productos de amplificación de la PCR-SDHA de muestras negativas a la PCR-V4 de LVPR, se observa un producto de 386 pb (líneas punteadas) 8) muestra N° 66, flecha lo que indica en esta muestra que la integridad del ADN no fue adecuada.

## 6.4 SECUENCIACIÓN

Los productos de amplificación positivos a la PCR-V4 fueron cortados y purificados (figura 13) y los productos con mayor concentración de ADN se enviaron al servicio de secuenciación. Se obtuvo un total de 74 secuencias nucleotídicas de muestras de caprinos donde 31 fueron de LSP (cuadro 8) y 35 de tejidos (cuadro 7). Las secuencias obtenidas de caprinos del Estado de México se distribuyeron de la siguiente forma: ID-59 Ls, Ms, Plm, Bzo y Gm; ID-104 Ms, Plm, Bzo, Rño y Gm; 179 Hdo, Plm, Bzo, Rño y Gm; ID-78 Ms, Ls, Bzo y Gm; ID-342 Bzo, Plm, Rño y Gm; ID-149 Plm, Hdo, Bzo, Rño y Gm; ID-10 Rño, Ls, Gm y Bzo, y de tejidos de caprinos del Estado de Guanajuato fueron: ID-566 Ls, Bzo, Gm). Por otro lado, se obtuvo un total de 12 secuencias de LSP de ovinos (cuadro 9), y una secuencia de 1 bazo (Cuadro 7).

Cuadro 8: Resultados obtenidos de las pruebas de ELISA, PCR y de las secuencias obtenidas de LSP de caprinos infectados por LVPR, distribuidos por fase clínica y Estado del país.

ESTADO	SEROLOGÍA (+/-)				PCR-V4 (+/-)				SECUENCIAS			
	A	M	AM	SSX	A	M	AM	SSX	A	M	AM	SSX
B.C.S.	-	-	-	2/0	-	-	-	2/0	×	×	×	1
Coahuila	-	-	-	10/30	-	-	-	10/30	×	×	×	1
Edo. Méx.	6/0	4/0	6/0	0	5/1	3/1	5/1	0	5	1	7	0
Guanajuato	11/0	-	3/0	20/0	8/3	-	1/2	7/13	4	×	2	7
Queretaro	2/0	-	-	13/0	1/1	-	-	10/3	1	×	×	4
Sinaloa	-	-	-	5/0	-	-	-	5/0	×	×	×	3
Sonora	-	-	-	19/0	-	-	-	2/17	×	×	×	1
Veracruz	-	-	-	11/1	-	-	-	12/0	×	×	×	3
<b>TOTAL</b>	<b>19/0</b>	<b>4/0</b>	<b>9/0</b>	<b>80/31</b>	<b>14/5</b>	<b>3/1</b>	<b>6/3</b>	<b>48/63</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>20</b>

A: artritis; M: Mastitis; AM: artritis y mastitis; Ssx: asintomáticos; (x): sin secuencias generadas; (+): positiva a la prueba; (-): negativa a la prueba.

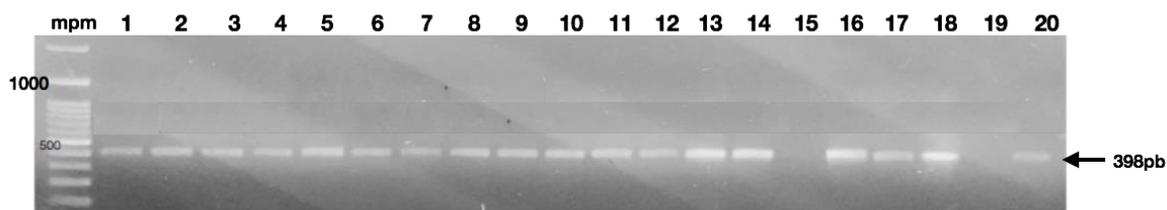


Figura 13: Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5% de los productos purificados de la PCR-V4; MPB (marcador de pares de bases), 1-2) 104 bazo, 3) 059 membrana sinovial, 4) 059 LSP, 5) 059 glándula mamaria, 6) 059 pulmón, 7) 059 bazo, 8) 104 pulmón, 9) 104 riñón, 10) 104 glándula mamaria, 11) 104 membrana sinovial, 12) 104 LSP Edo. Méx., 13) 104 bazo, 14) 179 células de líquido sinovial, 16) 3FES LSP Edo. Méx., 17) 17FES LSP Edo. Méx., 18) 10 membrana sinovial, 20) 91 LSP Coah.

Cuadro 9: Resultados obtenidos de las pruebas de ELISA, PCR y de las secuencias obtenidas de LSP de ovinos infectados por LVPR, distribuidos por Estado del país.

ESTADO	SEROLOGÍA (+/-)				PCR-V4 (+/-)				SECUENCIAS			
	A	M	AM	SSX	A	M	AM	SSX	A	M	AM	SSX
B.C.S.	-	-	-	9/1	-	-	-	0/10	-	-	-	X
Durango	-	-	-	0	-	-	-	0/1	-	-	-	X
Edo. Méx.	-	-	-	63/0	-	-	-	17/46	-	-	-	4
Hidalgo	-	-	-	9/0	-	-	-	7/2	-	-	-	4
Sonora	-	-	-	14/0	-	-	-	2/12	-	-	-	2
Veracruz	-	-	-	8/0	-	-	-	1/7	-	-	-	1
<b>TOTAL</b>	-	-	-	<b>104/1</b>	-	-	-	<b>28/77</b>	-	-	-	<b>11</b>

A: artritis; M: Mastitis; AM: artritis y mastitis; Ssx: asintomáticos; (x): sin secuencias generadas; (+): positiva a la prueba; (-): negativa a la prueba.

La especificidad y similitud de las muestras secuenciadas fueron corroboradas con el programa Blastn. Se muestra un ejemplo de Blast de una muestra secuenciada de la PCR-V4 (figura 14). Los cromatogramas de las secuencias fueron revisados utilizando el programa CHROMAS y MySequence para corroborar la calidad de la secuenciación obtenida.



Figura 14: Ejemplo del Blastn de una secuencia de nucleótidos obtenida con la PCR-V4. Se realizó un blastn a las muestras secuenciadas para identificar la especificidad del producto de la PCR con el gen *env* de LVPR, encontrando una identidad del 84% y una cobertura del 98%.

## 6.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

### 6.5.1 GENOTIPIFICACIÓN CON ÁRBOLES FILOGENÉTICOS CONSTRUIDOS CON MrBayes

El árbol construido con este algoritmo se puede observar en la figura 15. Donde se muestra un claro agrupamiento de 12 secuencias en el genotipo A y un segundo núcleo de secuencias de tejidos de varios animales, los cuales tienen más tendencia a genotipos A y el resto de las secuencias se asociaron al genotipo B.

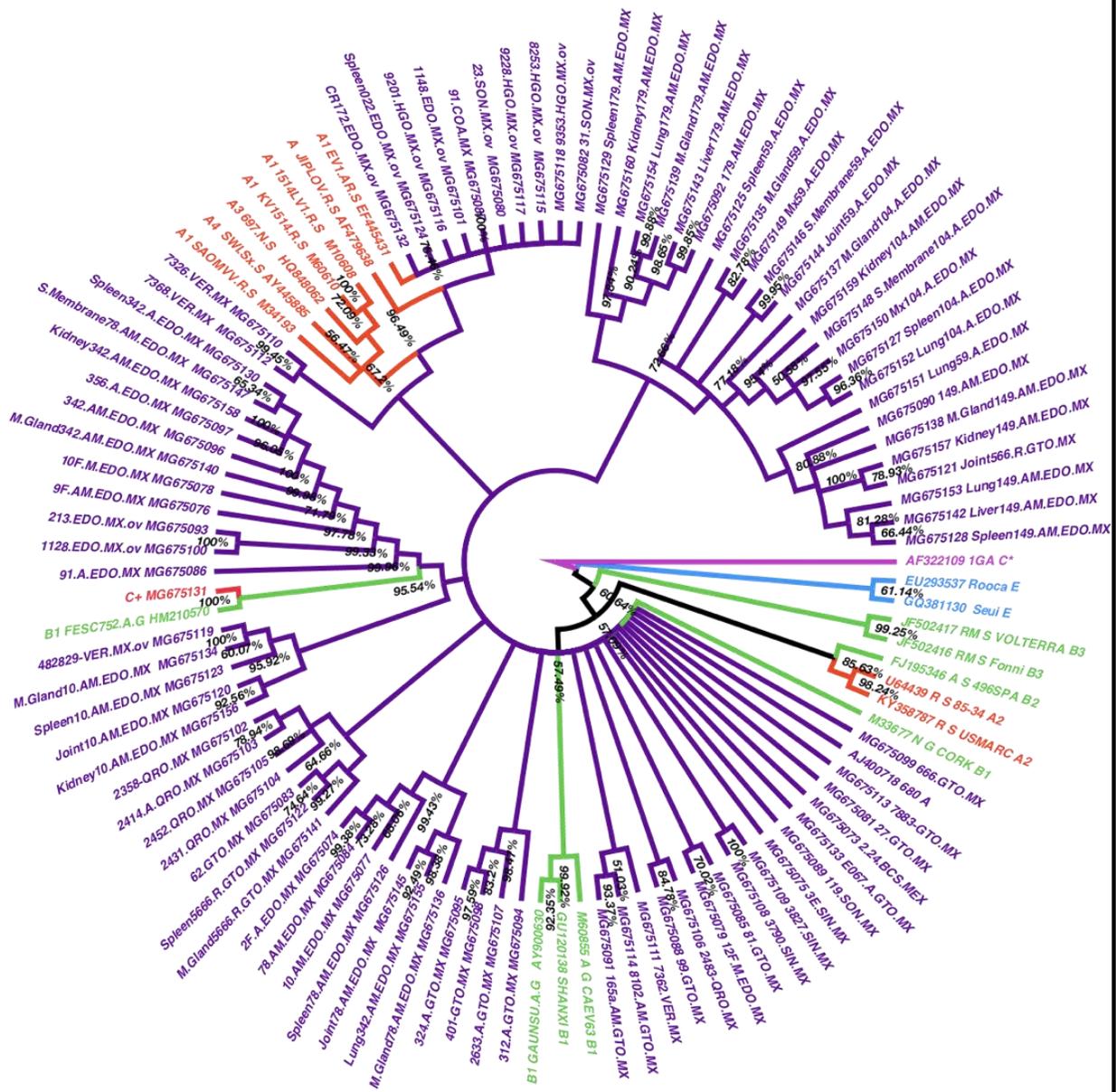


Figura 15: Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas de la región V4 del gen *env* de LVPR de muestras obtenidas en el presente estudio (morado) y de referencia (varios colores). Las secuencias de referencia genotipo A se muestran en color naranja, genotipo B en verde, genotipo C en rosa y genotipo E en azul; (C+) control positivo secuencias de la cepa FESC-752: Identificación de animales en el árbol filogenético: número de identificación del animal seguido de una letra que corresponde al cuadro clínico (A: cuadro artrítico, AM: cuadro con artritis y mastitis, M: mastitis, R: cuadro respiratorio, sin letra: asintomáticos); espacio y continua una letra correspondiente al estado (BCS: Baja California Sur, COA: Coahuila, GTO: Guanajuato, HGO: Hidalgo, EDO: Estado de México, QRO: Querétaro, SON: Sonora, SIN: Sinaloa y VER: Veracruz). Aquellas muestras que son de tejido le antecede la identificación del tejido (Bzo: Bazo, Gm: Glándula mamaria, Hdo: Hígado, LS: Células del sedimento del líquido sinovial, MS: Membrana sinovial, Plm: Pulmón, Rño: Riñón), Ov: ovinos. Todas las muestras incluyen número de acceso proporcionado por el GenBank. Números en negro: valores de bootstrap.

Debido al agrupamiento de las secuencias de tejidos de varios animales, se analizó más detalladamente las secuencias y se construyó un árbol filogenético basado de igual forma en MrBayes, el cual se muestra en la figura 16. Donde se observa una clara agrupación de estas secuencias con el genotipo B.

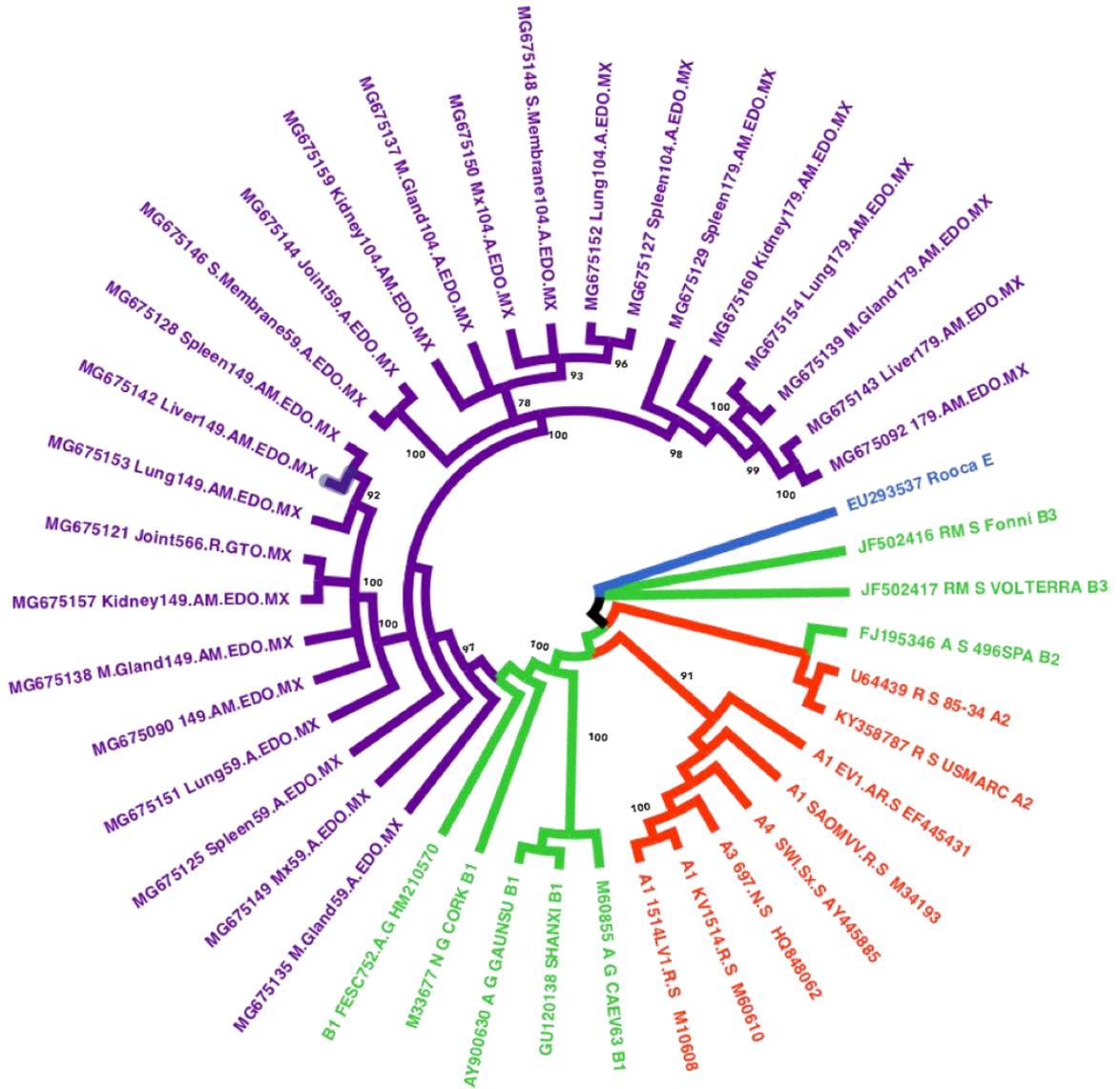


Figura 16: Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas de la región V4 del gen *env* de LVPR de muestras discrepantes (morado) en el árbol anterior y de referencia (varios colores). Las secuencias de referencia genotipo A se muestran en color naranja, genotipo B en verde y genotipo E en azul; (C+) control positivo de la cepa FESC-752: Numero de acceso GenBank, número de identificación del animal seguido de una letra que corresponde al cuadro clínico (A: cuadro artrítico, AM: cuadro con artritis y mastitis, M: mastitis, R: cuadro respiratorio, sin letra: asintomáticos); espacio y continua una letra correspondiente al estado (BCS: Baja California Sur, COA: Coahuila, GTO: Guanajuato, HGO: Hidalgo, EDO: Estado de México, QRO: Querétaro, SON: Sonora, SIN: Sinaloa y VER: Veracruz). Aquellas muestras que son de tejido le antecede al número de animal la identificación del tejido (bazo: Spleen, glándula mamaria: M. Gland, hígado: Liver, liquido sinovial:Joint, Membrana Sinovial: S. Membrane, Pulmón: Lung, Riñón: Kidney), Ov: ovinos. Números en %: valores de bootstrap.

## 6.5.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO CON MAXIMUM-LIKELIHOOD

Se realizó la construcción de árbol filogenético con las secuencias nucleotídicas obtenidas. Los números en las ramas muestran los valores de bootstrap (1000 repeticiones).

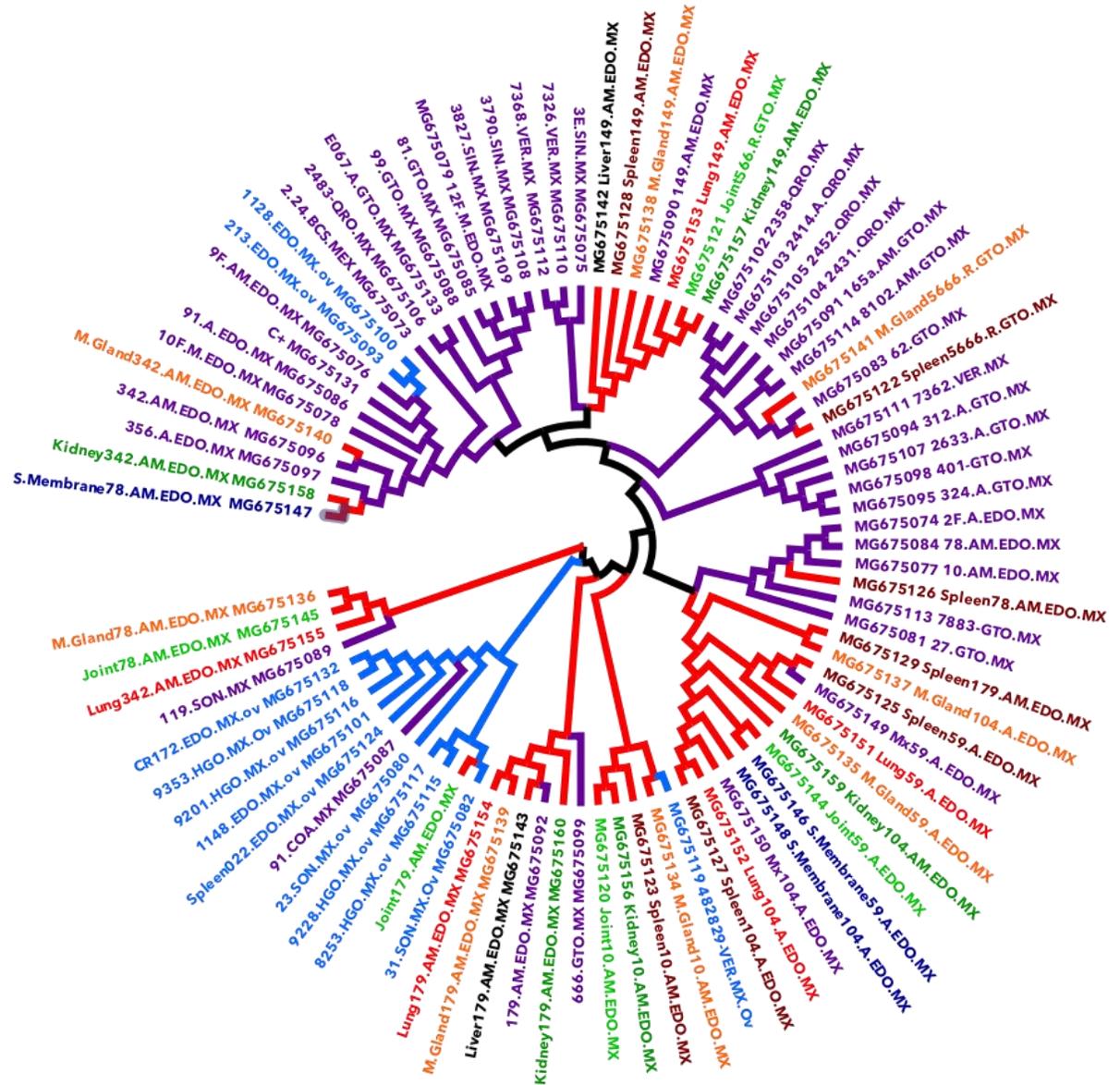


Figura 17: Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas de la región V4 del gen *env* de LVPR de muestras obtenidas en el estudio (morado). (C+) control positivo secuencias de la cepa FESC-752: Numero de acceso GenBank, número de identificación del animal seguido de una letra que corresponde al cuadro clínico (A: cuadro artrítico, AM: cuadro con artritis y mastitis, M: mastitis, R: cuadro respiratorio, sin letra: asintomáticos); espacio y continua una letra correspondiente al estado (BCS: Baja California Sur, COA: Coahuila, GTO: Guanajuato, HGO: Hidalgo, EDO: Estado de México, QRO: Querétaro, SON: Sonora, SIN: Sinaloa y VER: Veracruz). Aquellas muestras que son de tejido le antecede al número de animal la identificación del tejido (bazo: Spleen, glándula mamaria: M. Gland, hígado: Liver, liquido sinovial:Joint, Membrana Sinovial: S. Membrane, Pulmón: Lung, Riñón: Kidney), Ov: ovinos. Números en %: valores de bootstrap.

### 6.5.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LSP CON MAXIMUM LIKELIHOOD

Se realizó la construcción del árbol filogenético solo con secuencias de aminoácidos obtenidas de sangre periférica (LSP), los números en las ramas muestran los valores de bootstrap (1000 repeticiones). Las secuencias muestran una agrupación por regiones y no así por fase de infección, lo que si se percibe es un agrupamiento por especie (muestras en negro ovinos).

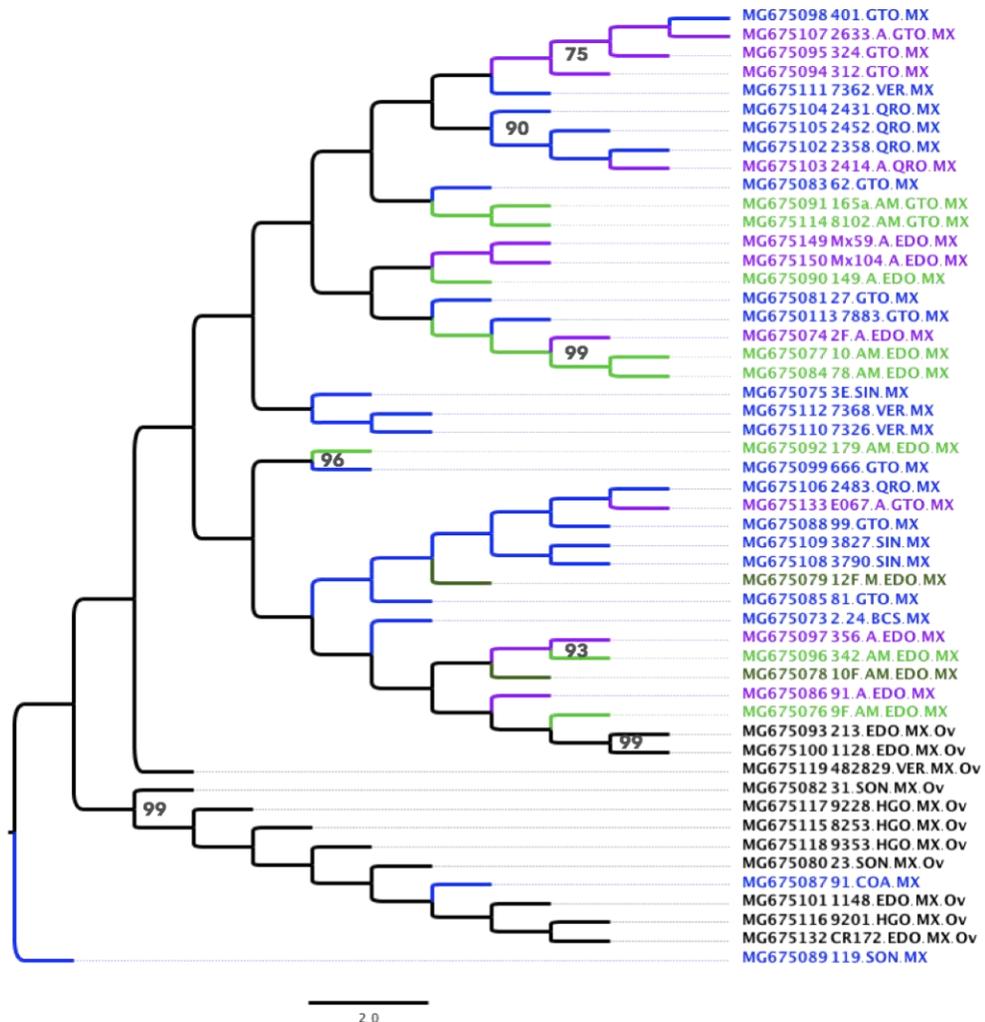


Figura 18: Árbol filogenético construido con secuencias de aminoácidos deducidos de la región V4 del gen *env* de LVPR de LSP. Identificación de animales en el árbol filogenético: Numero de acceso GenBank, número de identificación del animal seguido de una letra que corresponde al cuadro clínico (A: cuadro artrítico, AM: cuadro con artritis y mastitis, M: mastitis, R: cuadro respiratorio, sin letra: asintomáticos); espacio y continua una letra correspondiente al estado (BCS: Baja California Sur, COA: Coahuila, GTO: Guanajuato, HGO: Hidalgo, EDO: Estado de México, QRO: Querétaro, SON: Sonora, SIN: Sinaloa y VER: Veracruz). Ov: ovinos. Números en %: valores de bootstrap.

#### 6.5.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS TEJIDOS CON MAXIMUM LIKELIHOOD

Se realizó un árbol con secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de tejidos de ovinos y caprinos, utilizando el método de Maximum Likelihood con 1000 bootstrap. En general se observó en la mayoría de las secuencias un agrupamiento entre tejidos del mismo animal. En los animales 059, 078 se observa una variabilidad entre sus secuencias, ubicándose en diferentes ramas del árbol, la muestra de glándula mamaria del animal 104 y la muestra de pulmón de la cabra 342 se ubicaron fuera de su mismo grupo de secuencias.

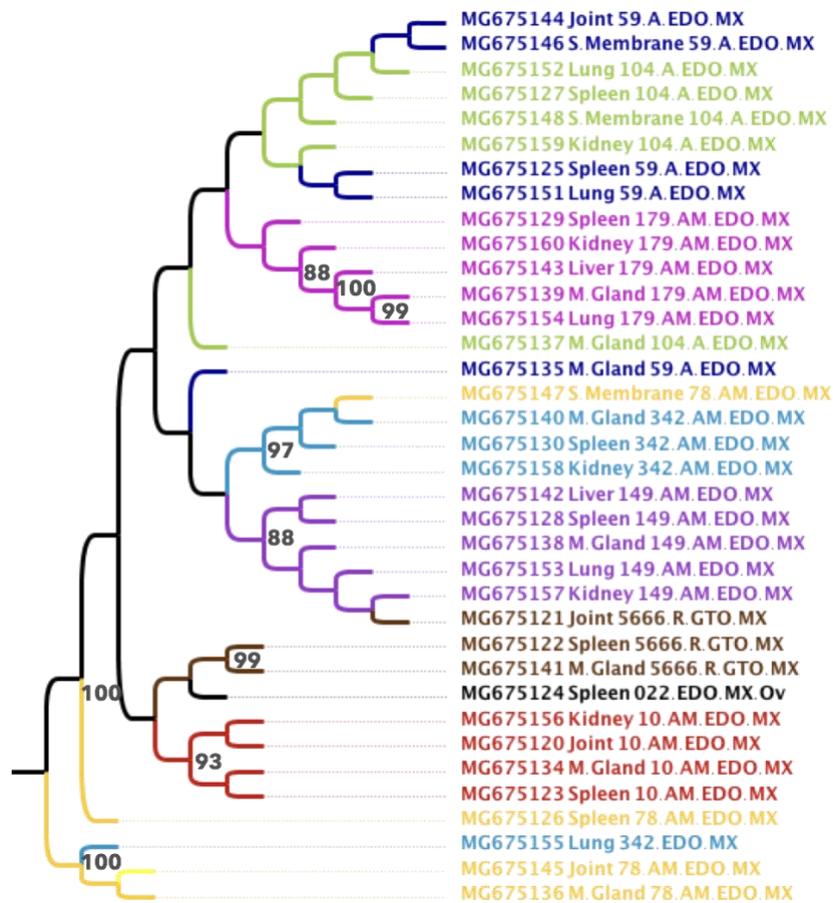


Figura 19: Árbol filogenético de construido con secuencias deducidas aminoácidas de la región V4 del gen *env* de LVPR de tejidos. Numero de acceso GenBank, número de identificación del animal seguido de identificación del tejido (bazo: Spleen, glándula mamaria: M. Gland, hígado: Liver, liquido sinovial: Joint, Membrana Sinovial: S. Membrane, Pulmón: Lung, Riñón: Kidney), continua la letra que corresponde al cuadro clínico (A: cuadro artrítico, AM: cuadro con artritis y mastitis, M: mastitis, R: cuadro respiratorio, sin letra: asintomáticos); espacio y continua una letra correspondiente al estado (BCS: Baja California Sur, COA: Coahuila, GTO: Guanajuato, HGO: Hidalgo, EDO: Estado de México, QRO: Querétaro, SON: Sonora, SIN: Sinaloa y VER: Veracruz). Ov: ovinos. Números en %: valores de bootstrap.

## 6.6 ALINEAMIENTOS

La región V4 de la proteína de superficie codificada por el gen *env* de los LVPR tiene un tamaño del 80-84 aminoácidos. Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos obtenidas se muestran en las figuras 25 a la 30, agrupadas por genotipo y fase clínica (**Asintomática genotipo A, Asintomática genotipo B, respiratorio genotipo B y artritis-mastitis y artritis-mastitis genotipo B**). Para una mejor visualización de los cambios en las secuencias de aminoácidos se generaron secuencias consenso para cada uno de los grupos, la cual se muestra en la parte superior del alineamiento correspondiente. Las secuencias de LSP de animales asintomáticos genotipo A (**G.A.LSP.Ssx**) (figura 20) presentan pocos cambios en los aminoácidos a diferencia de las secuencias de LSP de los animales asintomáticos del genotipo B (**G.B.LSP.Ssx**) (figura 21), que presentaron un mayor número de cambios aminoacídicas en las posiciones 9, 12, 23, 40, 47, 49, 54, 56, 58,70, 71, 78 a la 84, con una inserción en la posición 70 de un N (Asparagina), en la secuencia 119-S la cual fue la más variable (figura 30). Las secuencias de muestras de **tejido** de los animales con cuadro **respiratorio genotipo B (G.B.Tej.R)** que fueron tres (Gm5666, Bzo5666 y Art5666) y en las cuales se observan cambios aminoacídicas en las posiciones 42, 47, 49, 78 y 83, la muestra Art5666 fue la más variable (figura 24). En las secuencias de aminoácidos de las muestras de **tejido** de animales con cuadro clínico de **artritis, mastitis y artritis-mastitis genotipo B** (figura 23) se observaron un alto número de cambios en las posiciones 12, 14, 23, 31, 41, 45, 50, 57, 66, 70, 71, 78-83, observando además una inserción en la posición 35 en las secuencias Gm78, Ls78 y Plm342 y deleciones en 3 aminoácidos (81,83 y 84) en las secuencias de tejido del animal 179. Las secuencias de aminoácidos de las muestras de **LSP** de animales con cuadro clínico de **artritis, mastitis y artritis-mastitis genotipo B** (figura 22) muestran cambios en muchas posiciones 12, 14, 23, 31, 40, 49, 54, 56, 58, 65, 70, 77 a la 82; cabe mencionar que son cambios de más de 3 aminoácidos por posición, existiendo una alta variación en las secuencias. Por otra parte, se identificaron posiciones conservadas entre las secuencias, las cuales fueron en los residuos 3, 4, 6, 8, 10, 11, 15, 16, 21, 22, 25,

26, 27, 29, 30, 33, 36, 37, 39, 41, 43, 44, 46 50, 52, 53, 55, 57, 60, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 71-73, 76 y 85. Se identificaron las cinco cisteínas conservadas en todas las secuencias en las posiciones 10, 36, 39, 60 y 73, las cuales se identifican en todos los alineamientos con una flecha roja. Adicionalmente se identificaron secuencias divergentes a los genotipos A y B mostradas en la figura 25, las cuales fueron alineadas con una secuencia de referencia identificando deleciones e inserciones, así como variaciones en los aminoácidos.

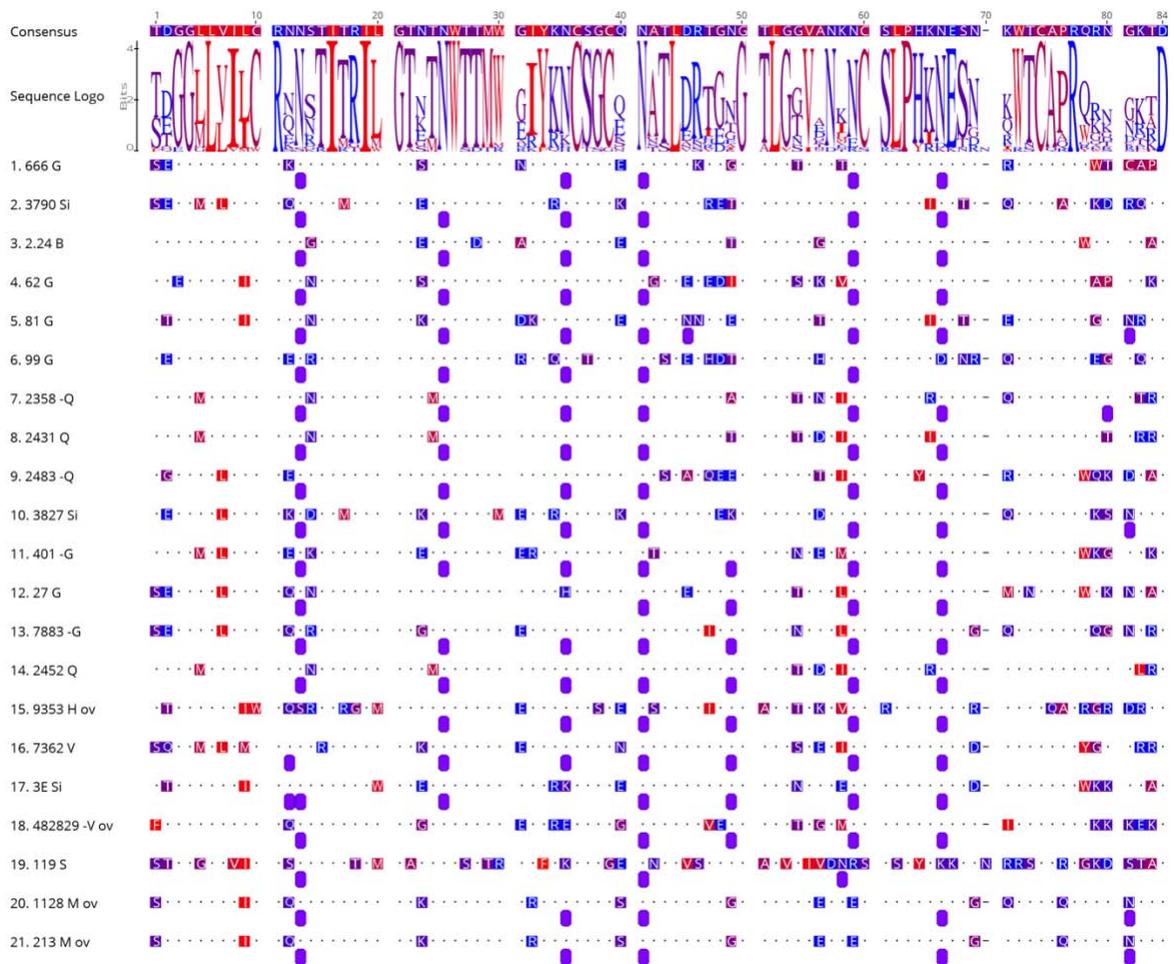


Figura 21: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de LSP de animales asintomáticos del genotipo B. Anotación en rojo; cisteínas conservadas en las secuencias; cuadros morados indican sitios de glicosilación; aminoácidos con fondo de color muestran los sitios con cambio en esa posición.

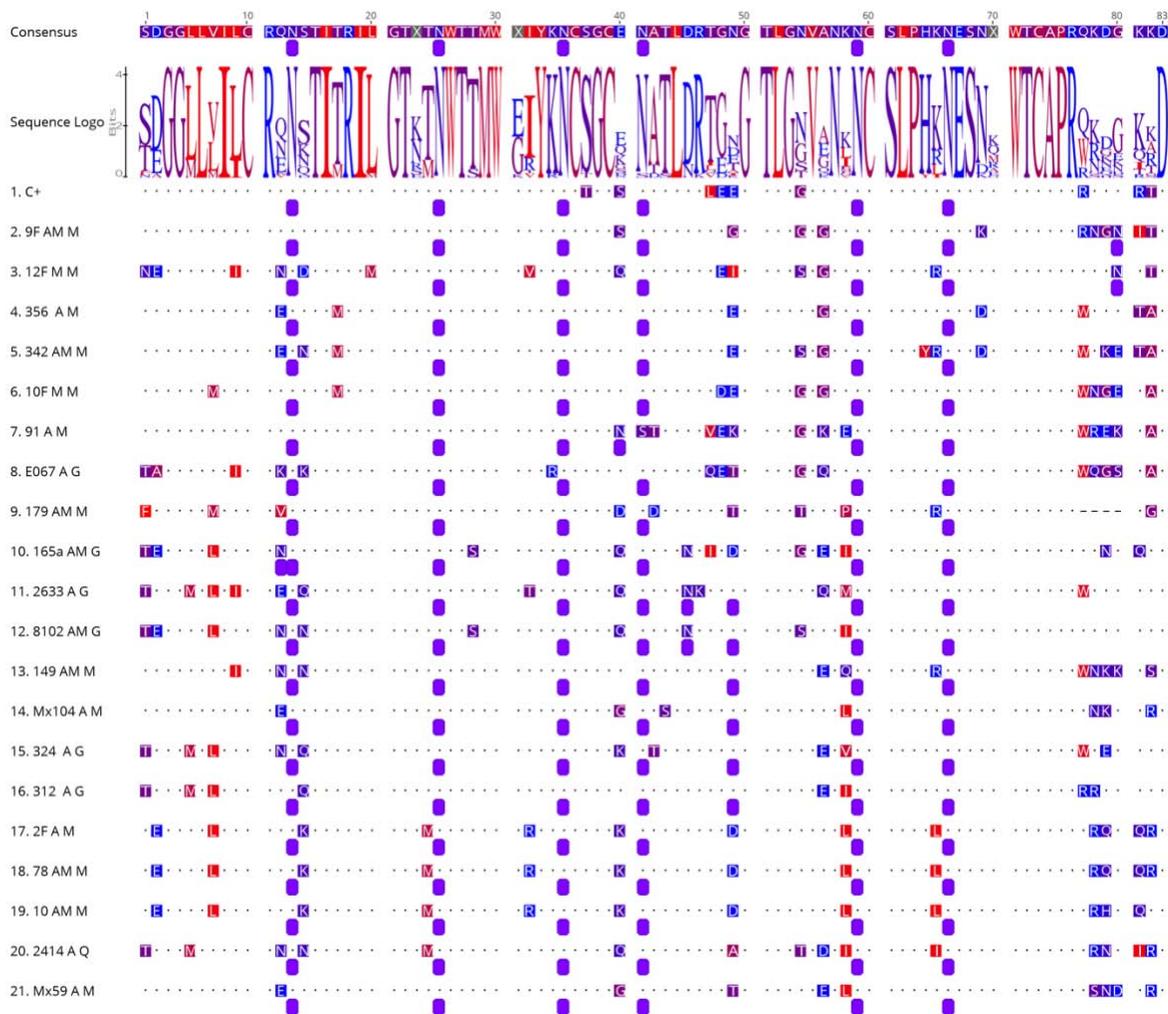


Figura 22: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de LSP de animales con cuadro clínico de artritis, mastitis y artritis-mastitis del genotipo B. Anotación en rojo; cisteínas conservadas en las secuencias; cuadros morados indican sitios de glicosilación; aminoácidos con fondo de color muestran los sitios con cambio en esa posición.

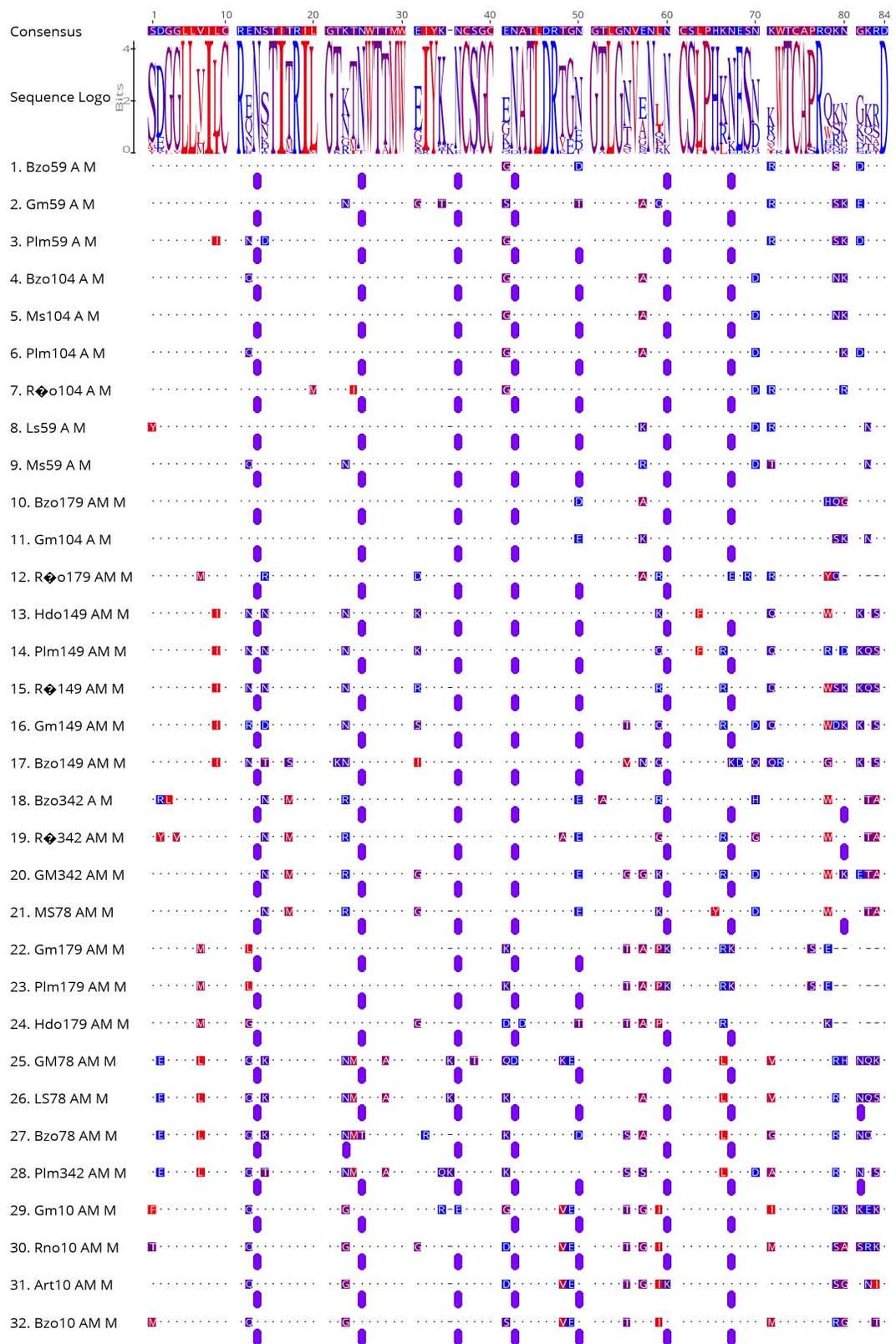


Figura 23: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de tejido de animales con cuadro artritis-mastitis del genotipo B; cuadros morados indican sitios de glicosilación.

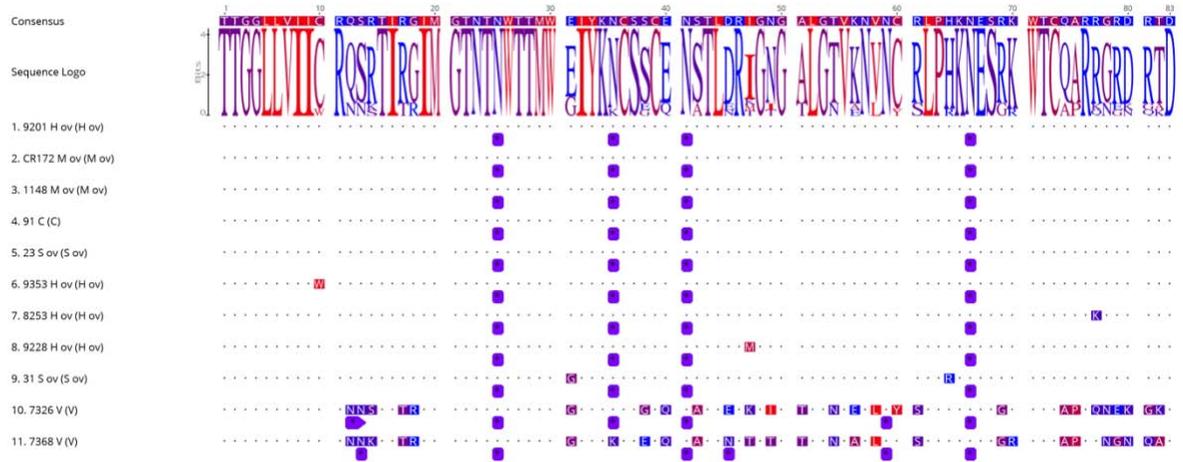


Figura 20: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de LSP de animales asintomáticos del genotipo A. Anotación en rojo; cisteínas conservadas en las secuencias; cuadros morados indican sitios de glicosilación; aminoácidos con fondo de color muestran los sitios con cambio en esa posición.

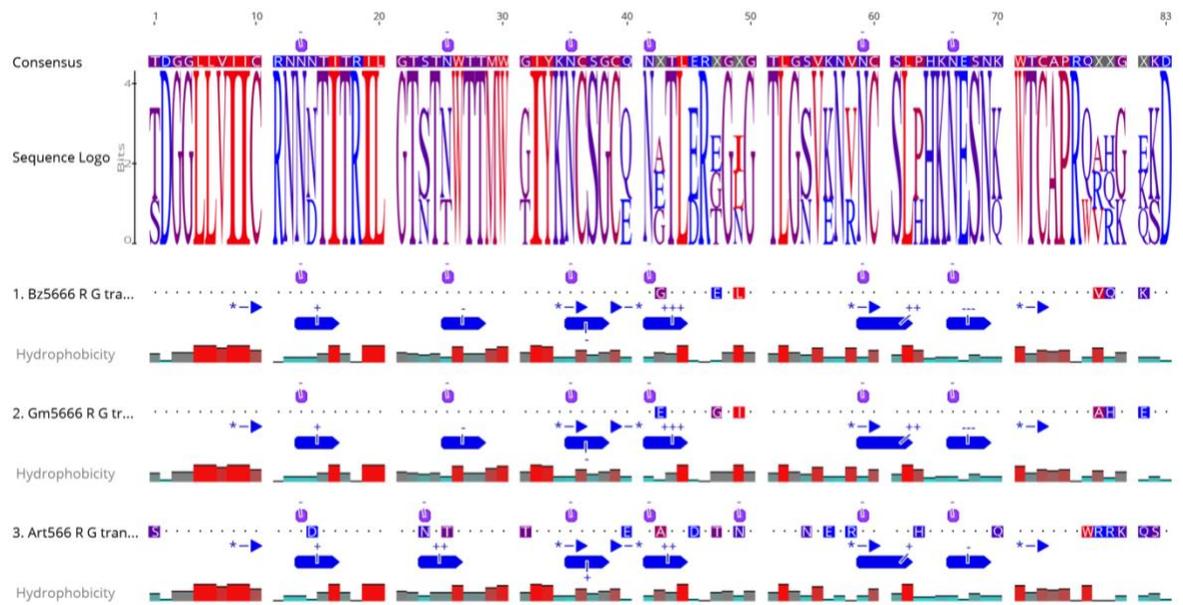


Figura 24: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR derivadas de tejido de animales con cuadro Respiratorio del genotipo B. Anotación en rojo; cisteínas conservadas en las secuencias; cuadros morados indican sitios de glicosilación; aminoácidos con fondo de color muestran los sitios con cambio en esa posición.

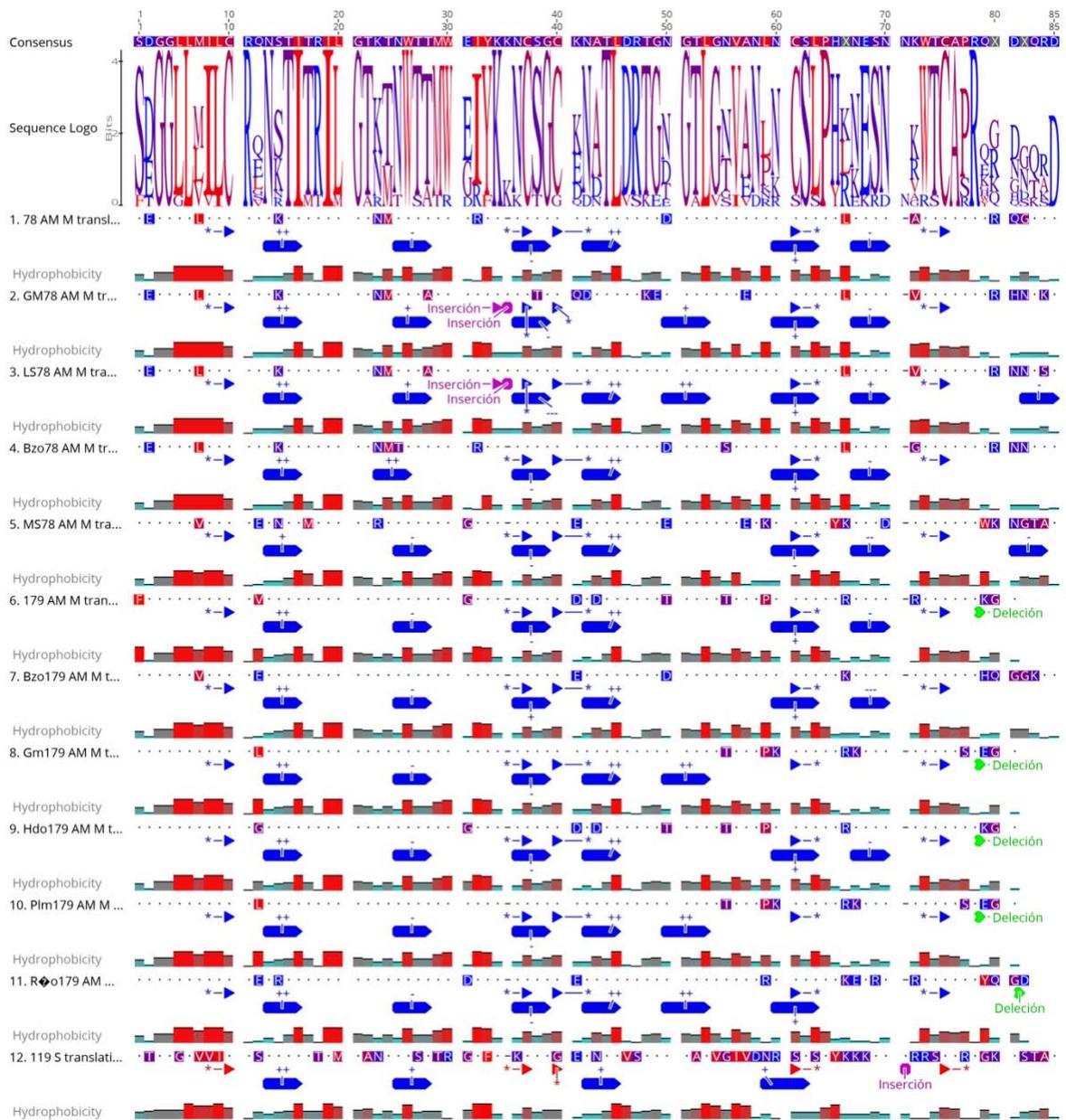


Figura 25: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LVPR atípicas. Anotación en rojo; cisteínas conservadas en las secuencias; cuadros morados indican sitios de glicosilación; aminoácidos con fondo de color muestran los sitios con cambio en esa posición.

## 6.7 MATRIZ DE IDENTIDAD

Una vez obtenidas las secuencias se analizó la similitud entre ellas categorizándolas por cuadro clínico y genotipo, a las cuales se les realizó una matriz de identidad con el programa bioinformático Geneious. Se determinó los rangos de similitud de las secuencias obtenidas en el presente estudio, observando que el grupo de animales asintomáticos genotipo A presentaron un rango de similitud más estrecho (69.9% - 100%), lo que indica que las secuencias son más homogéneas a diferencia del grupo de animales asintomáticos genotipo B, que tuvieron una alta variabilidad y los rangos de similitud fueron de 56.70% hasta el 100%, los datos se muestran a detalle en el cuadro 10.

Cuadro 10: Rangos de similitud entre las secuencias de aminoácidos de LVPR obtenidas en el presente estudio y con secuencias de referencia.

<b>Fase de infección</b>	<b>Nº de secuencias</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>MÁXIMO</b>	<b>MÍNIMO</b>
<b>G.A.LSP.Ssx</b>	11	93.29%	100%	69.90%
<b>G.B.LSP.Ssx</b>	21	75.35%	98.80%	56.70%
<b>G.B.LSP.AM</b>	21	82.29%	100%	73.50%
<b>G.B.Tej.AM</b>	32	83.24%	100%	72.30%
<b>G.B.Tej.R</b>	3	85.50%	97.20%	79.50%

G.A.LSP.Ssx: Secuencias de leucocitos de sangre periférica cuadro asintomático genotipo A; G.B.LSP.Ssx: Secuencias de leucocitos de sangre periférica cuadro asintomáticos genotipo B; LSP A, AM y M-B: Secuencias de leucocitos de sangre periférica cuadro de artritis, mastitis y artritis-mastitis genotipo B; Tej. A, AM y M-B: Secuencias de tejido cuadro de artritis-mastitis genotipo B; tejido R-B: Secuencias de tejido cuadro respiratorio genotipo B

## 6.8 SINÓNIMOS (dS) Y NO SINÓNIMOS (dN)

Las secuencias obtenidas fueron evaluadas con el programa bioinformático en línea SNAP v2.1.1 con el cual se calculó la proporción de sustituciones no sinónimas / sinónimas (dN/dS) entre los grupos, observando valores de proporción superiores a 0.15 hasta el 0.75, lo que muestra un alto número de sustituciones de nucleótidos entre las secuencias, con una interpretación simple cuando dN / dS es mayor a 1 es una selección positiva, si la proporción de dN / dS : 1 la selección es neutra y si la proporción de dN / dS es menor a 1 es una selección negativa, entre mayor es el valor indica una tendencia a sustituciones no sinónimas (dN), los resultados se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11: Resultados obtenidos del análisis de secuencias nucleotídicas de LVPR determinando las sustituciones no sinónimas (dN) y sustituciones sinónimas (dS).

Fase de infección	Nº de secuencias	Máximo dN/dS	Mínimo dN/dS	dS	dN	Promedio dN/dS	SD dN/dS	SE dN/dS
<b>G.A.LSP.Ssx</b>	11	0.79	0	0.48	0.06	0.15	0.22	0.005
<b>G.B.LSP.Ssx</b>	21	1.65	0.08	0.87	0.02	0.26	0.16	0.001
<b>G.B.LSP.AM</b>	21	5.91	0	0.54	0.14	0.37	0.54	0.003
<b>G.B.TeJ.AM</b>	32	4.58	0	0.44	0.12	0.42	0.48	0.001
<b>G.B.TeJ.R</b>	3	1.62	0.32	0.36	0.12	0.75	0.75	0.25

G.A.LSP.Ssx: Secuencias de leucocitos de sangre periférica cuadro asintomático genotipo A; G.B.LSP.Ssx: Secuencias de leucocitos de sangre periférica cuadro asintomáticos genotipo B; G.B.LSP.AM: Secuencias de leucocitos de sangre periférica cuadro de artritis-mastitis genotipo B; G.B.TeJ.AM: Secuencias de tejido cuadro de artritis-mastitis genotipo B; G.B.TeJ.R: Secuencias de tejido cuadro respiratorio genotipo B; dS: sustitución sinónima; dN: sustitución no sinónima; dN/dS: proporción obtenida (sustitución no sinónima/ sustitución sinónima); SD: desviación estándar; SE: error estándar.

## 6.9 DISTANCIA GENÉTICA

La distancia genética se calculó con el programa MEGA® 6.06 utilizando un método de estimación de variancias (p-distancia), la distancia genética se refiere a que tan distantes están las muestras obtenidas entre ellas, el número de diferencias de aminoácidos por sitio entre las secuencias son mostradas en el cuadro 12. Los valores promedio observados entre las secuencias de aminoácidos de animales asintomáticos genotipo A tuvieron un promedio mínimo de distancia entre sus secuencias de 0.119 (1.19%), siendo los animales asintomáticos genotipo B los que tuvieron una mayor distancia genética entre sus secuencias 0.296 (29.6%). A pesar de que las secuencias de animales con cuadro clínico de artritis-mastitis genotipo B (LSP AM) también presentaron una alta distancia genética 0.196 (19.6%). Los valores de distancia genética en general obtenidos oscilaron de 0.119 a 0.296 lo que indica que las secuencias son muy distantes entre ellas.

Cuadro 12: Valores comparativos de la distancia genética entre las secuencias de los diferentes cuadros clínicos.

Fase de infección	Nº Secuencias	Promedio	Mínimo	Máximo	SD	SE	n
<b>G.A.LSP.Ssx</b>	11	0.119	0	0.34	0.15	0.0027	55
<b>G.B.LSP.Ssx</b>	21	0.296	0.01	0.62	0.10	0.0005	210
<b>G.B.LSP.AM</b>	21	0.196	0	0.28	0.05	0.0002	210
<b>G.B.TeJ.AM</b>	32	0.173	0	0.33	0.06	0.0001	511
<b>G.B.TeJ.R</b>	3	0.193	0.07	0.25	0.1	0.0333	3

G.A.LSP.Ssx: Leucocitos de sangre periférica asintomáticos genotipo A; G.B.LSP.Ssx: LSP asintomáticos genotipo B; G.B.LSP.AM: LSP artritis-mastitis genotipo B; G.B.TeJ.R: respiratorio genotipo B; SD: desviación estándar; SE: error estándar; n= número de análisis de comparativas por el programa realizadas.

## 6.10 VESPA® (VIRAL EPIDEMIOLOGY SIGNATURE PATTERN ANALYSIS)

Se utilizó el programa VESPA® para analizar las secuencias obtenidas y detectar patrones firma contra un conjunto de secuencias de referencia. VESPA calcula la frecuencia de cada aminoácido en cada posición (columna) en una alineación de las secuencias consulta y de las secuencias de fondo, y de esta forma seleccionara las posiciones para las cuales los caracteres más comunes en el conjunto de secuencias de consulta difieren de aquel en el conjunto de secuencias de fondo (Figura 26-30).

### 6.11.1. SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A, COMPARADAS CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A

Las secuencias de la región V4 de LVPR derivadas de muestras de LSP de animales clasificados en este grupo muestran poca variabilidad de aminoácidos, sin embargo, el programa mostró 26 posiciones relevantes las cuales se observan en la figura 26.

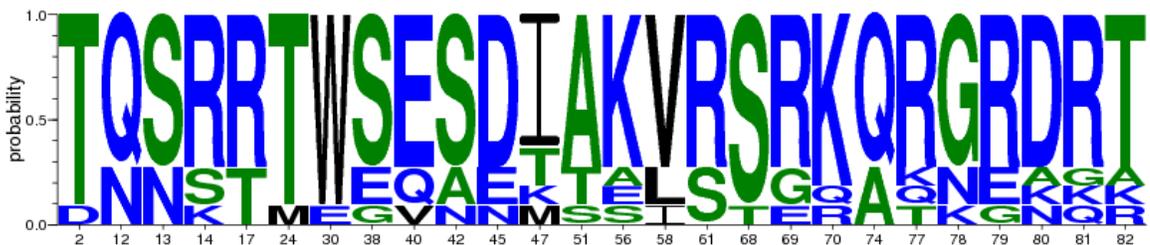


Figura 26: Gráfica de probabilidad de las posiciones de aminoácidos en la región V4 de LVPR mostrando patrones firma de muestras de animales asintomáticos del genotipo A Vs secuencias de referencia de animales asintomáticos del mismo genotipo.

### 6.10.2 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO B, COMPARADAS CON UNA SECUENCIA DE UN ANIMAL ASINTOMÁTICO GENOTIPO B

Las secuencias de la región V4 de LVPR derivadas de animales clasificados en este grupo conservaron pocos aminoácidos. El programa mostró 15 posiciones relevantes y sugestivas a patrones firma las cuales se observan en la figura 27, todos los análisis a detalle se muestran en el cuadro 13.

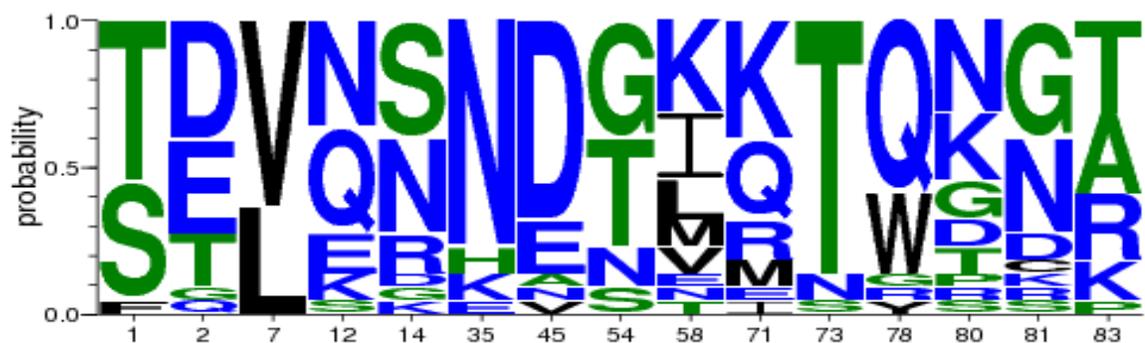


Figura 27: Gráfica de probabilidad de las posiciones de aminoácidos en la región V4 de LVPR mostrando patrones firma de muestras de LSP de animales asintomáticos genotipo B, comparadas con una secuencia de un animal asintomático genotipo B.

### 6.10.3 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CON ARTRITIS GENOTIPO B

El programa muestra 16 posiciones de aminoácidos atípicos, lo que podría ser posiciones relevantes o sugestivas a patrones firma las cuales se muestran en la figura 28.



#### 6.10.5 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE TEJIDOS DE ANIMALES CON CUADRO RESPIRATORIO GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CUADRO RESPITARORIO-MASTITICO GENOTIPO B

Las posiciones de aminoácidos atípicos que arroja el programa en las secuencias derivadas de animales con cuadro respiratorio comparadas con secuencias de referencia de animales con cuadro respiratorio-mastitis del genotipo B (figura 30).

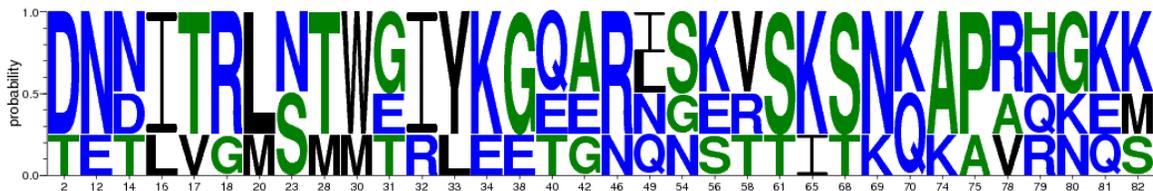


Figura 30: Gráfica de probabilidad de las posiciones de aminoácidos en la región V4 de LVPR mostrando patrones firma de muestras de Tejidos de animales con cuadro respiratorio genotipo B comparado con secuencia de referencia de animales con cuadro respiratorio-mastitis genotipo B.

#### 6.11 ENTROPÍA

Se realizó él estudió de entropía para determinar la posición con mayor variabilidad natural utilizando el programa en línea Entropy, el cual genera una comparativa de la posición más variable con respecto a una secuencia background o de referencia disponibles en el GenBank. Las secuencias de referencia de LVPR utilizadas para la comparativa de animales con cuadros artrítico fueron HM210570 FESC752-B1, AY900630 GANSU-B1, M60855 CAEV63-B1, AJ400718 680 y FJ195346 496SPA-B2; las secuencias de referencia para hacer las comparativas con animales con cuadro respiratorio fueron JF502417 VOLTERRA B3 y JF502416 Fonni B3 y la secuencia para hacer la comparativa con animales asintomáticos del genotipo A fue AY445885 SWI-A4. Algunas fases clínicas no tienen análisis de entropía debido a la falta de secuencias de referencia. El programa de entropía genera una representación gráfica comparativa entre ambos grupos (referencia contra las secuencias problema), estas gráficas muestran el valor de entropía para cada posición, lo que

representa una medida cuantitativa. Las líneas azules en la gráfica muestran el valor de entropía baja por posición y en rojo se muestra el valor de entropía alta (diferencia estadística significativa). Los valores positivos correlacionados a la entropía de las secuencias de referencia tienen un rango de 0 a 1 y los valores negativos de 0 a -1, están relacionados a los cambios o entropía de las secuencias de estudio se muestran de la figura 31 a la 35.

#### 6.11.1 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A, COMPARADAS CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A

El gráfico obtenido con el programa de ENTROPY en las secuencias asintomáticas del genotipo A solo muestran valores de entropía baja y sin valor estadístico significativo como se muestra en la figura 31.

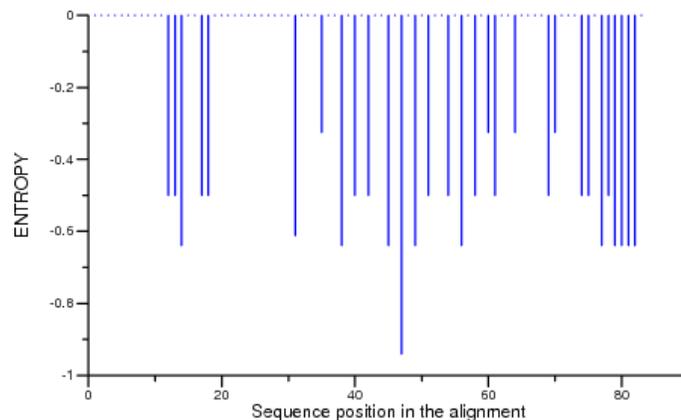


Figura 31: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de animales asintomáticos genotipo A contra secuencias de referencia de animales asintomáticos genotipo A.

### 6.11.2 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO B, COMPARADAS CON UNA SECUENCIA DE UN ANIMAL ASINTOMÁTICO GENOTIPO B

La gráfica obtenida por el programa de ENTROPY en las secuencias asintomáticas del genotipo B muestran varios cambios en 48 posiciones con entropía baja con valor estadístico no significativo (-1.376) como se muestra en la figura 32.

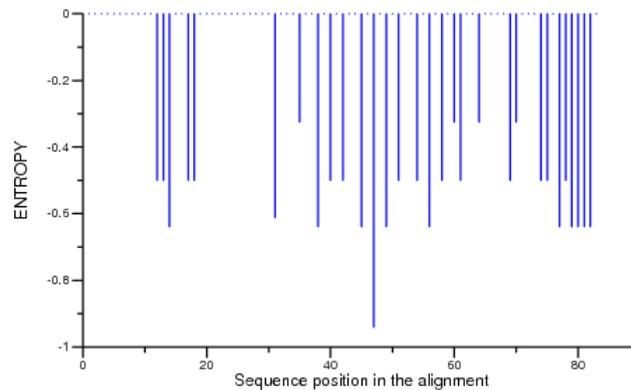


Figura 32: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de animales asintomáticos genotipo B contra secuencias de un animal asintomático (27-G) genotipo B.

### 6.11.3 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CON ARTRITIS GENOTIPO B.

La gráfica de entropía de la comparativa de este grupo y la de referencia, mostró 2 posiciones 18 (-0.637), 34 (-0.502) de relevancia estadística para las secuencias de interés con valores de entropía alta (rojo).

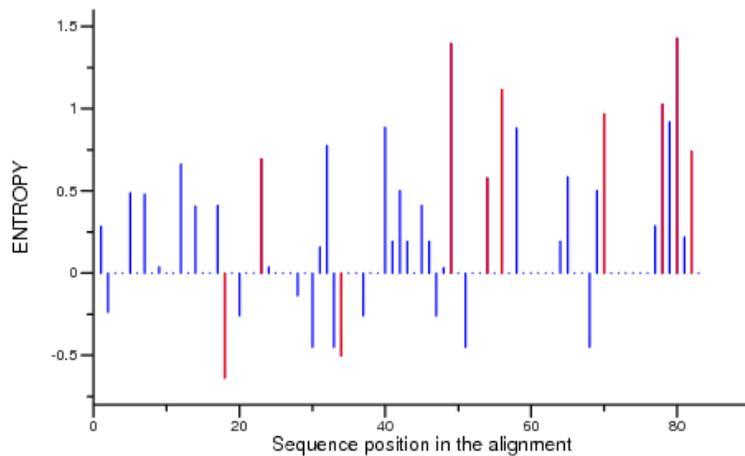


Figura 33: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de LSP de animales con cuadro artritis-mastitis genotipo B contra secuencias de referencia de animales con cuadro artrítico genotipo B

#### 6.11.4 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE TEJIDOS DE ANIMALES CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CON ARTRITIS GENOTIPO B

La gráfica de entropía del comparativo de este grupo y las de referencia, muestran 4 posiciones de relevancia estadística con entropía alta (rojo), las posiciones 56 (-1.042), 69 (-0.998), 79 (-1.213) y 81 (-1.705). Cabe mencionar que en la posición 34 existe una inserción en algunas secuencias, por lo que en la posición 35 en adelante está desfasada una posición de las otras secuencias.

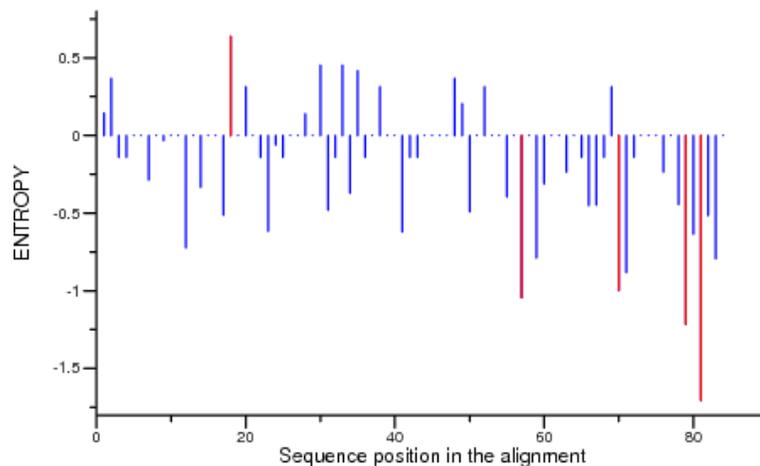


Figura 34: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de tejidos de animales con cuadro de artritis-mastitis genotipo B contra secuencias de referencia de animales con cuadro de mastitis genotipo B (Nº Acceso: EF685710-EF685712).

6.11.5 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN V4 DE LVPR OBTENIDAS DE TEJIDOS DE ANIMALES CON CUADRO RESPIRATORIO GENOTIPO B COMPARADA CON SECUENCIAS DE REFERENCIA DE ANIMALES CUADRO RESPITARORIO-MASTITICO GENOTIPO B.

Las secuencias obtenidas de animales con cuadro respiratorio del genotipo B fueron analizadas obteniendo 21 posiciones con entropía baja (líneas en azul) figura 35.

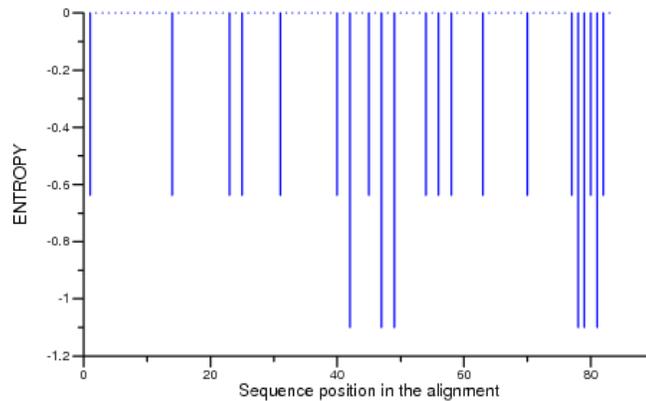


Figura 35: Gráfica de entropía realizada con secuencias de LVPR obtenidas de tejidos de animales con cuadro respiratorio genotipo B contra una secuencia de referencia de un animal con cuadro respiratorio-mastitis genotipo B (JF502416 Fonni B3).

En el cuadro 13 se muestra un resumen del análisis de las secuencias con los programas VESPA y Entropy, comparando los resultados obtenidos y las posiciones identificadas por ambos programas. Se observa una entropía baja en la mayoría de los cuadros clínicos y solo en las secuencias de LVPR obtenidas de LSP de animales con cuadro artritis-mastitis genotipo B se observó una entropía alta (números en rojo).

Cuadro 13: Posiciones identificadas en los programas de ENTROPY y VESPA por cuadro clínico.

Cuadro clínico	Número de secuencias	Posición ENTROPY	Posición VESPA
Genotipo A LSP asintomáticas (G.A.LSP.Ssx)	10	14 (-0.639), 45 (-0.639), 58 (-0.500), 70 (-0.325), 78 (-0.500), 79 (-0.639), 80 (-0.639), 82 (-0.639)	12, 13, 14, 17, 38, 40, 42, 45, 47, 51, 56, 58, 61, 69, 70, 74, 77, 78, 79, 80, 81 y 82.
Genotipo B LSP asintomáticas (G.B.LSP.Ssx)	21	14(-1.434), 45(-0.953), 54(-1.231), 58(-1.815), 70(-0.191), 79(-1.661), 80(-1.843), 82(-1.552)	1, 2, 7, 12, 14, 35, 45, 54, 58, 70, 79, 80 y 82
Genotipo B LSP Artritis-mastitis (G.B.LSP.AM)	21	14(0.406), 54(0.577), 70(0.965), 78(1.026), 79(0.918), 82(0.742)	1, 2, 9, 14, 18, 20, 31, 34, 47, 48, 49, 54, 70, 78, 79 y 82

Números en rojo: indica relevancia para ambos programas

Debido a la cantidad de muestras obtenidas por grupo, se decidió analizar las posiciones relevantes (cuadro 14) y concordantes de tres cuadros, estas posiciones fueron determinadas por los programas donde se encontró 4 posiciones relevantes 54, 78, 79 y 82.

Cuadro 14: Posiciones relevantes y aminoácidos presente por cuadro clínico

POSICIÓN	Fase	n=	Aminoácidos							
54	G.A.LSP.Ssx	10	8T	2N						
	G.B.LSP.Ssx	21	9G	7T	3N	2S				
	G.B.LSP.AM	21	10N	6G	3S	2T				
78	G.A.LSP.Ssx	10	8G	2N						
	G.B.LSP.Ssx	21	7R	6K	3G	2Q	1A	1W		
	G.B.LSP.AM	21	8K	6R	4N	1Q	1S	1-		
79	G.A.LSP.Ssx	10	8R	1G	1E					
	G.B.LSP.Ssx	21	7N	4K	3G	2D	2T	1P	1R	1S
	G.B.LSP.AM	21	6D	3G	3K	3N	2Q	1H		
82	G.A.LSP.Ssx	10	8T	1K	1A					
	G.B.LSP.Ssx	21	7T	5A	5R	3K	1P			
	G.B.LSP.AM	21	6K	5A	5R	3T	1G	1S		

LSP: Leucocitos de sangre periférica, Ssx: animales asintomáticos, G A: genotipo A, G B: genotipo B, AM: animales con cuadro clínico de artritis-mastitis.

## 6.12 SECUENCIAS OBTENIDAS POR TEJIDO (CUASIESPECIES)

Dentro de las secuencias que fueron deducidas a aminoácidos de la región V4 de LVPR que derivaron del bazo, pulmón, glándula mamaria y riñón, se observó que en las posiciones 79 y 82 (cuadro 15) sobresalía un posible patrón firma. Los órganos donde este patrón fue considerado relevante fue en el bazo en la posición 79-N/G y 82-R y en glándula mamaria en la posición 79-K. En riñón y pulmón no se percibe ningún patrón dominante, aunque cabe mencionar que la cantidad de secuencias obtenidas de los tejidos fue baja. Los alineamientos de las secuencias de LVPR de los tejidos analizados se muestran de la figura 36 y 37 donde se indican las posiciones relevantes ya descritas.

Cuadro 15: Posiciones de aminoácidos relevantes halladas en los diferentes tejidos.

Posición	Fase	n=	Aminoácidos				
79	Bazo	7	4N	2G	1K		
	Pulmón	5	2D	2K	1N		
	GM	7	4K	1H	1-		
	Riñón	5	1A	1K	1N	1Q	1R
82	Bazo	7	4R	1A	1S	1T	
	Pulmón	5	2R	2S	1-		
	GM	7	2K	2R	1S	1A	1G
	Riñón	5	1A	1K	1R	1S	1-

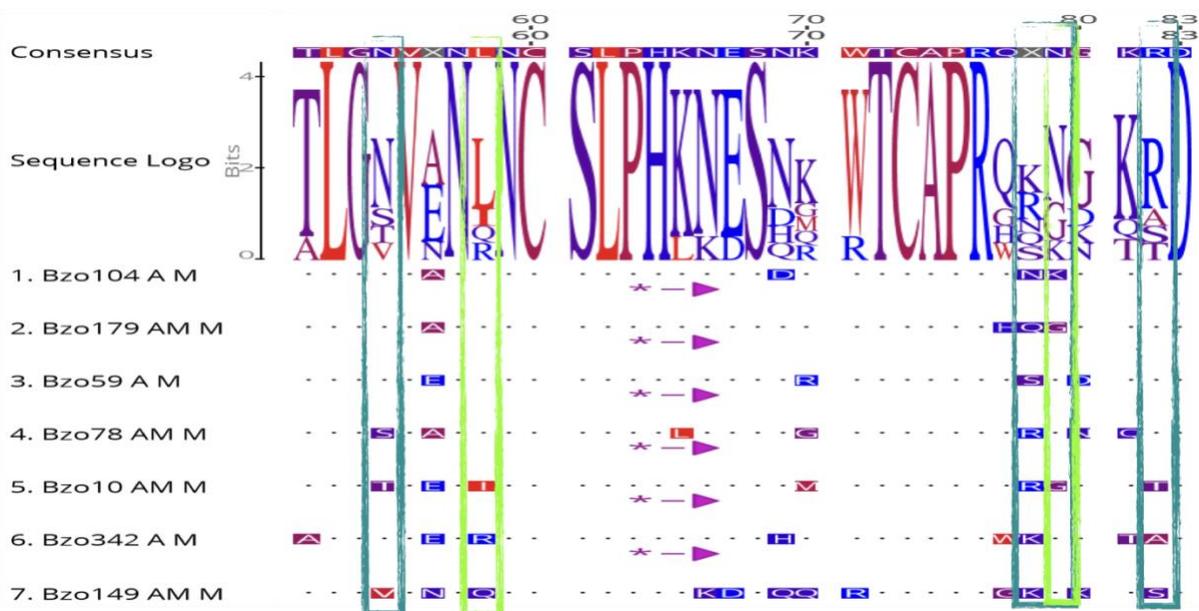


Figura 36: Alineamiento de aminoácidos de la región V4 de LVPR que muestra las posiciones 51 a la 83 del bazo obtenido de diferentes animales. Recuadro verde claro: indican residuos relevantes y recuadro verde oscuro: indican residuos relevantes en las secuencias obtenidas de LSP descritas previamente en el cuadro 18.

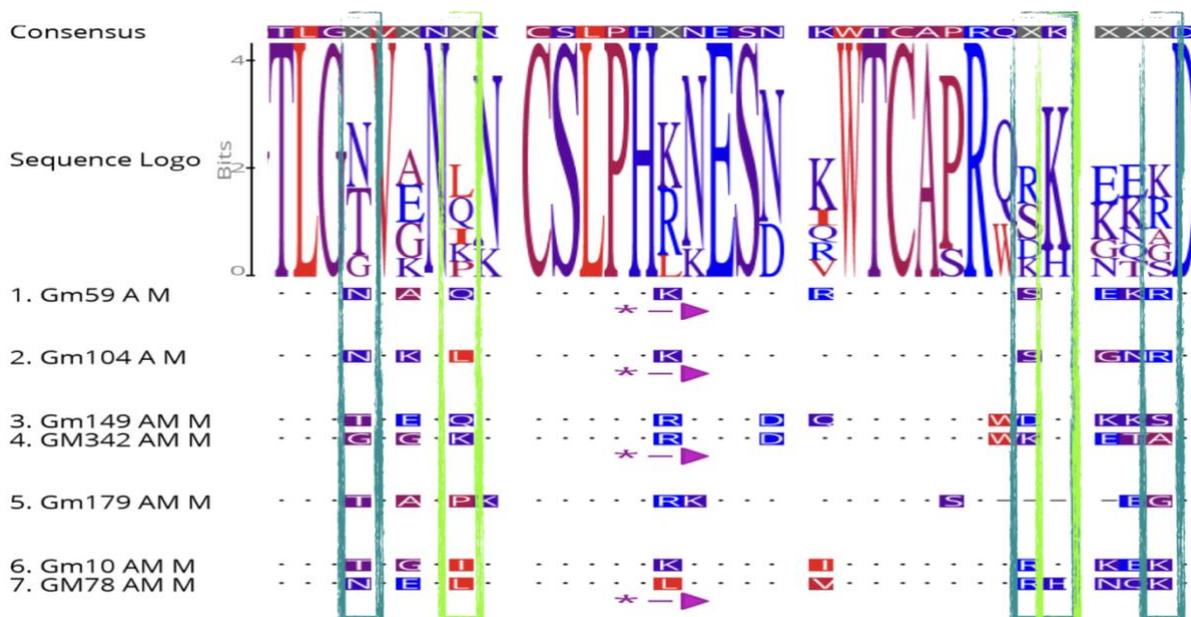


Figura 37: Alineamiento de aminoácidos de la región V4 de LVPR que muestra las posiciones 51 a la 83 de la glándula mamaria obtenido de diferentes animales. Recuadro verde claro: indican residuos relevantes y recuadro verde oscuro: indican residuos relevantes en las secuencias obtenidas de LSP descritas previamente en el cuadro 18.

## 6.13 CONSENSO

### 6.13.1 SECUENCIAS DE LVPR CONSENSO DERIVADAS DE LSP

Se generaron secuencias consenso las cuales fueron alineadas, observando 4 posiciones relevantes (figura 38), la línea gris punteada representa el último bucle de la región V4 de LVPR, donde se observa la presencia de un aminoácido específico por posición (recuadro verde) y cuadro artritis-martitis, asintomáticas tanto genotipo A como B. Esto podría sugerir un patrón firma en las secuencias consenso y un supuesto cambio en los aminoácidos específicos por cuadro (figura 38).

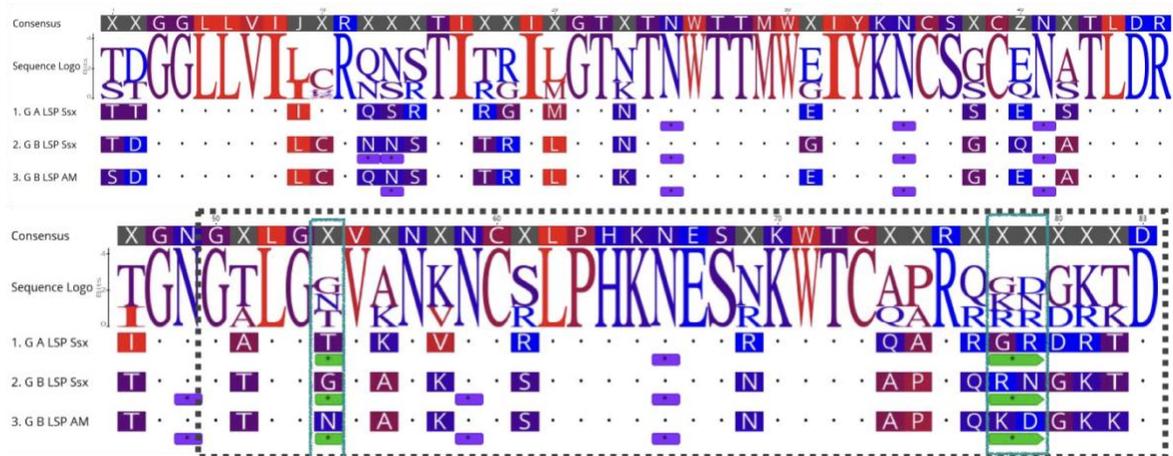


Figura 38: Alineamiento de secuencias consenso. G.A.LSP.Ssx: Secuencia consenso de animales asintomáticos genotipo A; G.B.LSP.Ssx: Secuencia consenso de animales asintomáticos genotipo B; G A LSP AM: secuencia consenso de animales con cuadro de artritis-mastitis genotipo B; anotación en verde y recuadro: indica los aminoácidos representados relevantes a un patrón.

### 6.13.2 ESQUEMATIZACIÓN DE LA ÚLTIMA BUCLE DE V4 DE LVPR DE SECUENCIAS CONSENSO

En la figura 39 se muestra la representación esquemática del bucle principal por fase de infección, formada entre la posición 45 a la 83 y generada a partir de las secuencias consenso obtenidas en el presente trabajo. Los aminoácidos identificados con mayor relevancia en el análisis de VESPA y ENTROPY se encuentran en las posiciones 54, 78, 79 y 82: **LSP asintomático genotipo A** posición 54 Treonina (80%), 78 Glicina (80%), 79 Arginina (80%) y 82 Treonina (80%); **LSP asintomático genotipo B** posición 54 Glicina/Treonina (76%), 78 Arginina/Lisina (62%), 79 Asparagina/Lisina/Glicina (67%) y 82 Treonina/Alanina (57%), y por último en **LSP artritis-mastitis genotipo B** posición 54 Asparagina/Glicina (76%), 78 Lisina/Arginina (67%), 79 Ácido aspártico/Glicina/Lisina (57%) y 82 Lisina/Alanina (52%), se enmarca en recuadro rojo. El porcentaje indicado en el paréntesis representa la frecuencia de ese aminoácido en el total de secuencias analizadas.

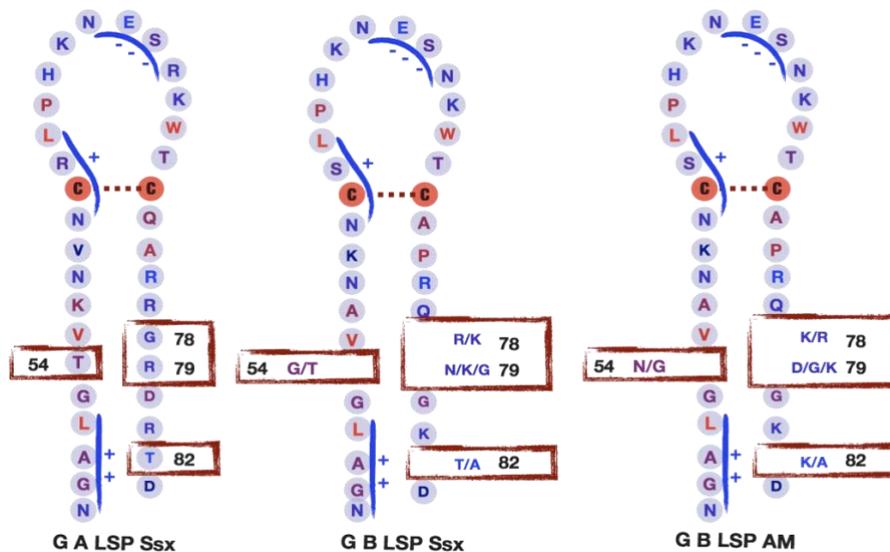


Figura 39: Representación esquemática del bucle principal por fase clínica, formada entre las posiciones 45 a la 83 y generada a partir de las secuencias consenso obtenidas en el presente trabajo. G.A.LSP.Ssx: Leucocitos de sangre periférica de secuencias obtenidas de animales asintomáticos genotipo A; G.B.LSP.Ssx: LSP de secuencias obtenidas de animales asintomáticos genotipo B; G.B.LSP.AM: LSP de secuencias obtenidas de animales con cuadro artritis-mastitis del genotipo B; +: Aminoácidos con cargas positivas; -: Aminoácidos con cargas negativas.

### 6.13.3 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE SECUENCIAS DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO A

De las secuencias obtenidas por fase de infección y genotipo, se generaron secuencias consenso las cuales se utilizaron para poder realizar la predicción de la estructura proteica (Figura 45 a la 49). Todas las secuencias presentaron 5 cisteínas (rojo) a excepción de la secuencia 119S. Estas cisteínas brindan una conformación de 3 bucles (azul, amarillo y verde agua) dando una estructura cerrada. En todos los modelamientos se observó el mismo patrón estructural con excepción del modelamiento de la secuencia 119S, la cual es carente de 2 de las cisteínas posiciones 39 y 60 (figura 40).

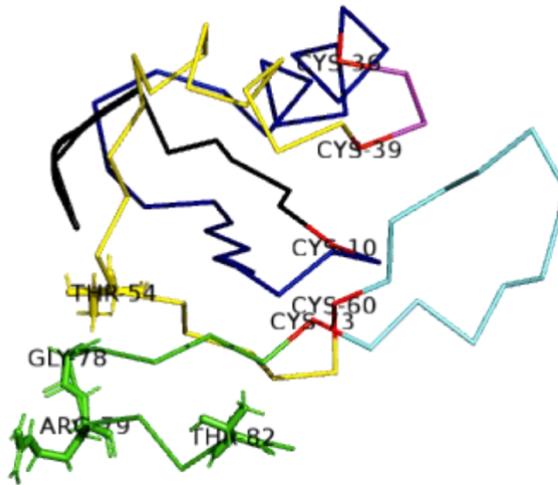


Figura 40: Modelamiento de la proteína V4 obtenida de LSP de animales asintomáticos genotipo A. Negro: cadena de inicio de los primeros residuos; rojo: cisteínas (CYS) residuo 10, 36, 39, 60 y 73; azul: primera bucle (residuo 11-35); amarillo: segunda bucle (residuo 40-59); verde agua: tercera bucle (residuo 61-72); verde: bucle final de la V4 (residuos 74-83).

#### 6.13.4 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE SECUENCIAS DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES ASINTOMÁTICOS GENOTIPO B

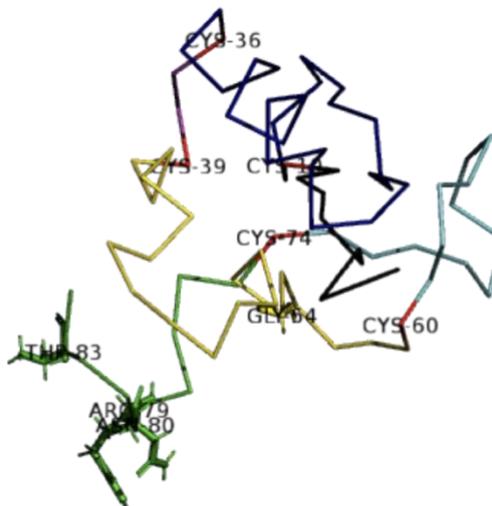


Figura 41: Modelamiento de la proteína V4 obtenidas de LSP de animales asintomáticos genotipo B. Negro: cadena de inicio de los primeros residuos; rojo: cisteínas (CYS) residuo 10, 36, 39, 60 y 73; azul: primera bucle (residuo 11-35); amarillo: segunda bucle (residuo 40-59); verde agua: tercera bucle (residuo 61-74); verde: bucle final de la V4 (residuos 75-83).

### 6.13.5 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE SECUENCIAS DE LVPR OBTENIDAS DE LSP DE ANIMALES CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B

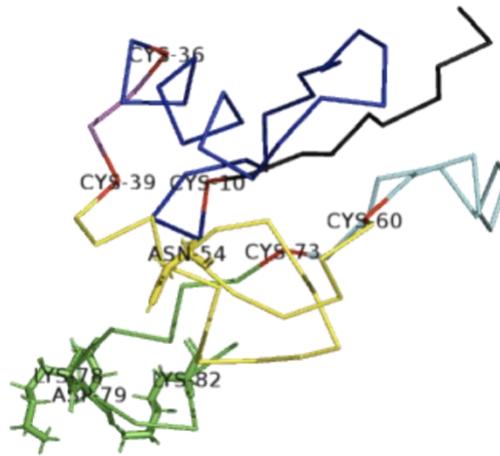


Figura 42: Modelamiento de la proteína V4 obtenidas de LSP animales con artritis-mastitis genotipo B: Negro: cadena de inicio de los primeros residuos; rojo: cisteínas (CYS) residuo 10, 36, 39, 60 y 73; azul: primera bucle (residuo 11-35); amarillo: segunda bucle (residuo 40-59); verde agua: tercera bucle (residuo 61-72); verde: bucle final de la V4 (residuos 74-83).

### 6.13.6 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE LA SECUENCIA 179 OBTENIDA DE LSP DE UN ANIMAL CON ARTRITIS-MASTITIS GENOTIPO B

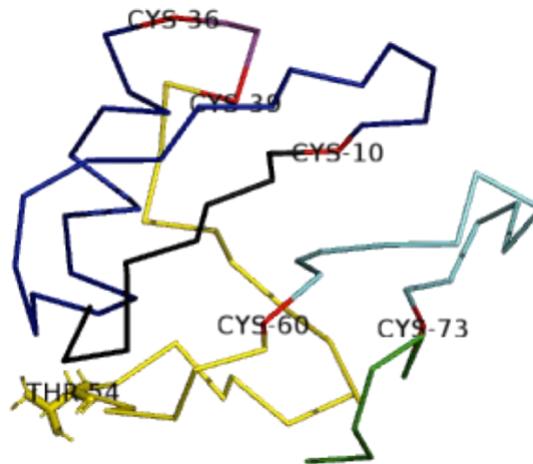


Figura 43: Modelamiento de la proteína V4 de la secuencia 179 obtenida de LSP de un animal con artritis-mastitis genotipo B. Negro: cadena de inicio de los primeros residuos; rojo: cisteínas (CYS) residuo 10, 36, 39, 60 y 73; azul: primera bucle (residuo 11-35); amarillo: segunda bucle (residuo 40-59); verde agua: tercera bucle (residuo 61-72); verde: bucle final de la V4 (residuos 74-83).

### 6.13.7 MODELO DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA V4 DE LA SECUENCIA 119S OBTENIDA DE LSP DE UN ANIMAL ASINTOMÁTICO GENOTIPO B

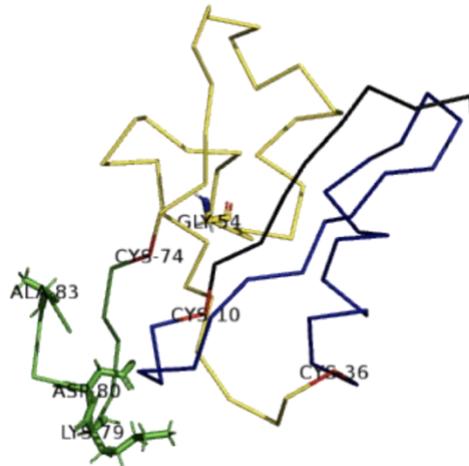


Figura 44: Modelamiento de la proteína V4 de la secuencia 119S obtenida de LSP de un animal con artritis-mastitis genotipo B. Negro: cadena de inicio de los primeros residuos; rojo: cisteínas (CYS) residuo 10, 36 y 73; azul: primera bucle (residuo 11-35); amarillo: segunda bucle (residuo 40-59); verde: bucle final de la V4 (residuos 74-84).

## 7. DISCUSIÓN

Estudios serológicos realizados en el país para identificar LVPR en caprinos se han generado desde finales de los 80, sin embargo, en ovinos estos estudios son más escasos, generados en los últimos 15 años. En el presente estudio se evaluaron muestras de plasmas de ovinos y caprinos de diferentes regiones del país, mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISAc), lo que permitió detectar un 86.7% de seropositividad (215/248) en muestras de 9 de los 10 estados evaluados. Estos resultados sugieren una alta prevalencia de la infección de LVPR en el país. Por otro lado, estos resultados contrastan con los estudios previamente reportados en 2013 y 2016, en donde las seroprevalencias en caprinos se han reportado desde 13.81% (n=362) al 17.6% (n=915) en el Estado de Guanajuato y otros estados<sup>93,94</sup>; en otro estudio realizado en Querétaro y Guanajuato., se obtuvo una seropositividad de 59.4% (n=303)<sup>95</sup>. En este estudio la seropositividad encontrada fue menor en los estados de Guanajuato. (13.7% n=34) y Querétaro. (6% n=15), lo que podría estar relacionado a un menor número de muestras evaluadas y la técnica utilizada. Es importante resaltar que se identificó la infección por LVPR en los Estados de Coahuila (4% n=40 de caprinos) y Baja California Sur (0.8% n=2 de caprinos y 3.6% n=10 ovinos) en los cuales no se habían hecho reportes previos. Aunque hay diversos reportes de prevalencias en el país y en particular en los estados analizados, las variaciones en las prevalencias podrían explicarse por el tamaño de muestra y el tipo de muestreo, así como por la prueba serológica.

Por otra parte, se detectó seropositividad para LVPR en 103 ovinos positivos (41.5%) mediante la técnica de ELISA, de los cuales 7 fueron (7.6% n=8) seropositivos de la raza pelibuey, en acorde con lo reportado por Sánchez et al., (2016)<sup>96</sup> donde identificaron 7 hembras seropositivas de la misma raza en diferentes regiones, confirmando que la infección por LVPR está ampliamente distribuida en ovinos y se debe realizar un estudio más amplio en esta especie.

Si bien el ensayo inmunoenzimático (ELISA) representa la técnica de elección para la detección de anticuerpos y que puede ser usada como prueba de tamizaje regular<sup>97</sup>, esta debe ser complementada con pruebas de moleculares de detección de ADN proviral. A este respecto, se recomienda un tamizaje inicial de la variación antigénica y genética local para optimizar la sensibilidad de estos ensayos<sup>97</sup>.

Varios trabajos<sup>35,86,98,99</sup> han descrito una alta tasa de mutación de LVPR y debido a ello se recomienda realizar pruebas combinadas de diagnóstico. En el presente trabajo se realizó serología (ELISA comercial) como pruebas tamiz; y PCR-V4 como técnica principal para la detección del provirus de LVPR. Comparando los resultados de serología con la PCR-V4 (anexo-II) se determinó que el 49.6% (123/248) fue concordante (positivos y negativos) y el 50.4% (125/248) fue discrepante a ambas técnicas, cabe resaltar que el objetivo del trabajo no fue una comparativa entre pruebas y los animales utilizados y seleccionadas en su mayoría fueron seropositivos, por lo que no existe una visión clara para determinar la eficiencia de la técnica de PCR-V4. Sin embargo, algunos estudios<sup>100</sup> refieren una concordancia del 57.3% entre la PCR y ELISA teniendo una especificidad del 59% y 100% respectivamente, la razón de la aparente baja sensibilidad de la PCR puede estar influenciada por el tipo de muestreo (por conveniencia), iniciadores y gen a identificar, tipo de célula utilizada y nivel de infección, ya que la cantidad de células diana (monocitos-macrófagos) presentes en sangre son escasas y el número de monocitos infectados se ha estimado de  $1 \times 10^6$  <sup>100</sup> en un animal infectado.

Con base en las secuencias nucleotídicas obtenidas en el presente estudio se realizó la construcción de árboles filogenéticos, utilizando dos algoritmos Maximum Likelihood y Mr Bayes, mostrando una mejor clasificación de las secuencias con el método Bayesiano, el cual fue concordante en la agrupación de las secuencias obtenidas y las de referencia como lo describen<sup>7,35,86</sup>. Se identificó por primera vez en el país la presencia del genotipo A en ovinos (n=10) y caprinos (n=2) asintomáticos los cuales representan el 13.8% (12/87) de las secuencias obtenidas en el estudio. Estas secuencias presentaron poca variabilidad con un

valor de similitud del 93.29% y una distancia genética del 11.9%. En el análisis de sustituciones sinónima y no sinónimas se encontró una selección negativa del 0.15, siendo más frecuentes los cambios sinónimos, concluyendo que las secuencias son muy similares entre ellas. Ramirez et al., (2011)<sup>7</sup> reportaron la presencia de genotipo B1 en ovinos y caprinos en el Estado de México, esto concuerda con los hallazgos obtenidos en el presente estudio en el mismo Estado del país en ovinos y caprinos, donde se identificó la presencia del genotipo B. Adicionalmente, se identificó en 7 Estados más la presencia del genotipo B en ambas especies, estos datos muestran que el genotipo viral de LVPR dominante en el país es el genotipo B, el cual representó el 86.2% (75/87) de las secuencias obtenidas. Se determinó que la divergencia entre las secuencias fue en un rango de 73.3% al 85.5% con una distancia genética de 17.3% al 29.6%, siendo las secuencias logradas a partir de leucocitos de sangre periférica de animales asintomáticos infectados con el genotipo B las más divergentes, a pesar de esta alta divergencia entre las secuencias del genotipo B la proporción entre sustituciones sinónimas y no sinónimas fue una selección negativa (0.75). Shah et al., (2004) propusieron la clasificación actual de LVPR en donde para agrupar entre genotipos los rangos de divergencia fueron del 25% al 37% en las secuencias nucleotídicas y para la división entre subtipos fue de 15% a 27%<sup>51</sup>. Considerando lo anterior es posible sugerir que entre las secuencias identificadas como genotipo B algunas de ellas podrían ser un subtipo genético nuevo que ampliaría los previamente descritos B1-B3, sin embargo, es necesario obtener secuencias de otros genes para sustentar esta posible identificación de otro subtipo. Estudios realizados en el VIH<sup>101</sup> de cepas con tropismo a macrófagos (macrotrópicas) han identificado una correlación entre la alta variabilidad y su capacidad de generar efecto citopático *in-vitro*. En el presente estudio se identificó una alta variabilidad en la región V4 de LVPR en animales asintomáticos del genotipo B encontrando en el rango superior de distancia genética un valor de 29.6%, lo que contrasta con lo identificado en VIH, sin embargo, en el presente estudio no se realizó el aislamiento viral que permitiera saber la capacidad citopática de los virus infectantes. En nuestro estudio se identificaron

secuencias de LVPR infectando ovinos y caprinos del genotipo A y B, esto refuerza lo previamente descrito de infecciones cruzadas inter e intra especie<sup>1,19,21,102,103</sup>.

Los alineamientos realizados para las secuencias de aminoácidos de la región V4 de LVPR por fase clínica, genotipo y tejido permitieron visualizar zonas conservadas entre las secuencias independiente a la fase clínica, genotipo y tejido, esto concuerda con lo descrito en otros estudios<sup>104,105</sup>. También fue posible identificar las 5 cisteínas conservadas dentro de la región V4 en todas las secuencias que también han sido previamente identificados en otros estudios<sup>104,105</sup>. Por otra parte, estos mismos estudios mencionan 5 sitios de glicosilación conservados, en contraste, en el análisis realizado de las secuencias obtenidas en este estudio se identificaron solo 4 sitios de glicosilación en las secuencias derivadas de los animales asintomáticos genotipo A y en un rango de 5 a 8 sitios para el caso de secuencias que derivaron de los tejidos, de LSP de algunos animales con cuadro clínico de artritis y mastitis de secuencias que fueron categorizadas como atípicas (figura 30). Una posible implicación de un mayor número de sitios de glicosilación es lo que ha sido descrito para el Virus de Leucemia Bovina (VLB)<sup>106</sup> en donde estos sitios de glicosilación se relacionan con un aumento en la antigenicidad.

Además de lo observado en los sitios de glicosilación en las secuencias atípicas, se identificaron deleciones e inserciones, así como una mayor variación en los aminoácidos que conforman la última bucle, como lo descrito por<sup>87,86</sup>. Skraban et. al, (1999) correlacionaron el escape a la neutralización por anticuerpos con deleciones en los últimos 27 aminoácidos de la región V4 del gen *env*, esto podría estar sucediendo con las deleciones halladas en las secuencias atípicas, sin embargo, se requieren de más estudios para comprobar esta hipótesis. Aunque la neutralización con anticuerpos no está relacionada con el tropismo celular<sup>105</sup>, la neutralización es de interés en los aspectos de diagnóstico y posibles alternativas de la inmunización.

Debido a que la región V4 ha sido relacionada con el tropismo de los LVPR hacia las células, la hipótesis planteada en este trabajo fue identificar patrones de secuencias de aminoácidos que se relacionaran con el desarrollo de enfermedad o ausencia de ella. Con la finalidad de encontrar estos patrones de secuencias se utilizaron dos programas (ENTROPY y VESPA). El programa ENTROPY identificó entropía baja (sin cambio estadísticamente significativos) en los grupos asintomático genotipo A y B, y por el contrario identificó una entropía alta en los animales con cuadro de artritis-mastitis genotipo B, destacando la relevancia de las posiciones 54, 78, 89 y 82, las cuales fueron identificadas con el programa VESPA, en conjunto es posible patrón firma (signature patterns) en estas cuatro posiciones y su posible relación con el desarrollo de la fase clínica. El patrón firma para los animales asintomáticos infectados con el genotipo A fue 54-T, 78-G, 79-R, y 82-T; el patrón firma para los animales asintomáticos infectados con el genotipo B fue 54-G/T, 78- R/K, 79-N/K/G, 82-T/A y el patrón firma para los animales con artritis-mastitis infectados con el genotipo B fue 54-N/G, 78-K/R, 79-D/G/K, 82-K/A. Aunque no fue posible identificar un solo aminoácido dominante en el patrón firma entre los grupos analizados, sí se logro identificar dos o más residuos dominantes en animales infectados con LVPR del genotipo B, en donde la principal diferencia entre la presencia o no de enfermedad radicó, en que estos aminoácidos invirtieron su frecuencia en las posiciones 78 y 79.

Estudios similares en otros virus donde su finalidad era identificar patrones firma, reportan un conjunto de aminoácidos o simplemente un cambio de un aminoácido en una sola posición, como en el caso de Newcastle (cepa velogénica) en la proteína F, en donde encontraron que tres aminoácidos básicos fueron frecuentes, lisina (K) o arginina (R) entre los residuos 113 y 116 y fenilalanina en el residuo 117. En contraste, en cepas de Newcastle avirulentas (lentogénicas) se ha encontrado que la proteína hemoaglutinina tiene una longitud más larga (577) y en las cepas patógenas es más corta (571)<sup>71,107</sup>.

En 1977 los químicos teóricos Eigen y Schuster, quienes acuñaron el término *cuasiespecie* para describir la evolución molecular, de conjuntos primitivos de moléculas replicadoras<sup>53</sup>

las cuales tienden a una distribución dinámica de genomas víricos no idénticos pero estrechamente relacionados entre sí sometidos a un proceso continuo de variación genética, competición y selección<sup>49</sup>. Lo anterior podría explicar la variabilidad de los patrones de aminoácidos en posiciones específicas, como los patrones que han sido reportados entre compartimentos que funcionan como órganos reservorios del VIH (tejido u órganos linfoides y cerebro) en secuencias de pacientes con cuadros neurológicos en VIH<sup>108</sup>. Uno de los últimos trabajos al respecto, identificaron 5 patrones firma en secuencias de VIH derivadas de tejido cerebral y 2 patrones firma en secuencias virales recuperadas del líquido cefalorraquídeo en pacientes con demencia asociada<sup>109</sup>. En otro estudio de VIH identificaron un patrón firma específico en secuencias derivadas de FCE, en las posiciones 5, 9, 13 y 19 del bucle V3 el cual correlacionó con un déficit neurocognitivo en los pacientes<sup>110</sup>. Aunque en los LVPR los cuadros clínicos descritos son al menos 4, en el presente estudio solo se pudo identificar animales con un cuadro general de artritis-mastitis, de los 6 órganos colectados a partir de 10 animales con este cuadro clínico solo en 2 de los órganos, bazo posición 79-N/G y 82-R y glándula mamaria posición 79-K, se percibe un hipotético patrón firma. Respecto a la presencia de cuasiespecies en la figura 24 se observa que, entre las secuencias obtenidas de diferentes órganos y animales, estas mantienen una relación filogenética entre los órganos del mismo individuo y no así entre órgano, esto nos indica que aunque las secuencias obtenidas del mismo animal pero de diferente órgano, estos muestran divergencia. No obstante, mantienen una estrecha relación genética. Es importante mencionar que para confirmar este hallazgo es necesario un mayor número de secuencias de análisis.

Estudios de sustituciones sinónimas/no sinónimas (dN/dS) reportan que una selección positiva es reflejada cuando la proporción de dN/dS es mayor a 1 y una selección negativa la proporción de dN/dS es menor a 1. Esto es usado comúnmente para detectar si las proteínas experimentan una adaptación<sup>91</sup>. Un análisis de dN/dS se realizó en las secuencias nucleotídicas de LVPR obtenidas en el presente estudio, encontrando valores menores a 1, aunque la distancia genética calculada fue alta en rangos de 11.9% a 29.6%, a pesar de esta

alta variabilidad en los nucleótidos los cambios identificados fueron sinónimos lo que indica una selección negativa. Se sabe que la patogénesis de LVPR es un complejo multifactorial (genética del huésped, genética del virus y presión inmune)<sup>111</sup>, donde receptores TLR activan la respuesta inmune innata (APOBEC3, TRIM5 $\alpha$ , Teterina) y adaptativa en respuesta a los PAMP y los componentes virales<sup>111,112,113</sup>. Cabe mencionar que es importante el papel que juega la genética del huésped, relacionado a la posible resistencia a la infección por LVPR y esta resistencia asociada a genes polimórficos relacionados con las proteínas de transmembrana como TLR-7 y TLR-8, receptores CCR5, MHC, TMEM154 y 38A<sup>114</sup>. Esto factores podría ser la causa del bajo nivel de infección y de ADN proviral, lo que dificulto un mayor número de ovinos positivos a PCR (27/105) con relación a serología (103/105), así como la falta de desarrollo de cuadros clínicos. Sin embargo, en el presente estudio no se realizaron los análisis pertinentes para determinar la respuesta inmune innata.

Por otro lado, se ha correlacionado una alta carga viral y proviral con el desarrollo de signos clínicos en ovinos<sup>115,116</sup>, este mecanismo se ha dilucidado a nivel celular encontrando que una alta carga proviral disminuye la actividad proteasomal<sup>117</sup> lo que impacta directamente en la eliminación del virus. En este trabajo no se midió la carga viral y proviral en los animales estudiados lo cual sería interesante para complementar los resultados obtenidos.

En el análisis realizado del modelamiento de la proteína derivada de la región V4 (80-84 aminoácidos) generó 3 bucles con las 5 cisteínas conservadas, lo cual difiere a lo descrito para el VIH en donde solo se forma un bucle de 33 a 35 aminoácidos<sup>67,118-127</sup>. Por otra parte, Skraban et. al, (1999)<sup>105</sup> refieren que en el tercer bucle que se genera por los enlaces disulfuro entre las cisteínas 39 y 60 de la región V4 de LVPR es homóloga al que se forma en la región V3 del VIH. El modelamiento de la región V4 en las diferentes secuencias consenso derivadas de diferentes etapas de infección, mostró que fueron muy similares, sin embargo, en las secuencias derivadas de la cabra 119S, este bucle no se forma, lo cual podría favorecer el escape ante los anticuerpos neutralizantes.

## 8. CONCLUSIONES

- ∴ Por serología se identificaron ovinos y caprinos de 10 estados del país infectados por LVPR, encontrando un 45.2% (112/248) de caprinos y 41.5% (103/248) de ovinos seropositivos. En la PCR-V4 solo se detectó 38.6% de los animales seropositivos.
- ∴ Se estudió la variabilidad de la región V4 del gen *env* de LVPR en ovinos y caprinos infectados naturalmente, a partir de 87 secuencias encontrando rangos de similitud y distancia genética de entre 75.3% a 100 % y 11.9% al 29.6% respectivamente, identificando los genotipos virales B y A.
- ∴ En el estudio de tejidos la PCR-V4 detectó el ADN proviral de LVPR en todos los órganos estudiados, siendo la glándula mamaria el órgano con mayor detección y en el hígado el de menor.
- ∴ Se detectaron hipotéticos patrones firma por genotipo y por fase clínica (asintomático y artritis-mastitis) en las posiciones 54, 78, 79 y 82 de la región V4 en LSP y en la posición 58 y 79 en tejidos de glándula mamaria y bazo de animales con cuadro de artritis-mastitis.
- ∴ En el modelamiento de la proteína de la región V4 de LVPR no hubo diferencia estructural entre las secuencias consenso de animales de diferentes fases de infección y genotipo, aún con cambios en el número de aminoácidos y de sitios de glicosilación, en contraste, cuando se identificó una secuencia con ausencia de algunas cisteínas el modelamiento fue diferente.

## 9. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

*A: Alanina*

Å: Ångström

A: Artríticos

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AEC: Artritis encefalitis caprina

AM: Artritis-mastitis

APOBEC3: Apolipoprotein B editing enzyme catalytic polypeptide-like 3

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

B.C.S: Baja California Sur

BIV: Virus inmunodeficiencia de los bovinos

Bzo: Bazo

*C: Cisteína*

C1: Región conservada 1

C4: Región conservada 4

CCR5: Quimiocina receptora tipo 5

cDNA: ADN complementario (por sus siglas en inglés)

Coah.: Coahuila

CTI: Complejo de transcripción inversa

CHI: China

*D: Ácido aspartico*

DEPC: Dietil pirocarbonato

dn: Sustituciones no sinonimas

dN/dS: Sustitución no sinónima/ sustitución sinónima

dNTP's: Deoxinucleósido trifosfato

ds: Sustituciones sinónimas

DTT: Ditiotreitól

dTTP: Desoxitimidina trifosfato

dUMP: Desoxiuridina monofosfatada

dUTP: Desoxiuridina trifosfato

dUTPasa: desoxiuridina trifosfato nucleótido-hidrolasa

*E: Ácido glutámico*

E: ácido glutámico

Edo. Méx.: Estado de México

EIAV: Virus anemia infecciosa equina

ELISA: Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas

ELISAc: Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas competitiva

ENG: Inglaterra

*env*: Gen de envoltura

ESCRT: Complejo de exportación endosomal (por sus siglas en inglés)  
*F: Fenilalanina*  
FCE: fluido cerebro espinal  
FIV: Inmunodeficiencia de los felinos  
*G: Glicina*  
G.A.LSP.Ssx: Genotipo A LSP asintomático  
G.B.LSP.AM: Genotipo B LSP artritis-mastitis  
G.B.LSP.Ssx: Genotipo B LSP asintomático  
G.B.Tej.AM: Genotipo B tejido artritis-mastitis  
G.B.Tej.R: Genotipo B tejido respiratorio  
*gag*: Gen de antígeno específico de grupo en inglés group-specific antigen  
GBM: Grado biología molecular  
Gm: Glándula mamaria  
gp: Glicoproteína  
Gto.: Guanajuato  
*H: Histidina*  
Hdo: Hígado  
Hgo.: Hidalgo  
HN: Gen hemaglutinina-neuraminidasa  
HN: Proteína e hemoaglutinina  
ICE: Islandia  
IDGA: Inmunodifusión en gel de agar  
IN: Integrasa  
ITA: Italia  
*K: Lisina*  
kb: Kilobase  
Ls: Líquido sinovial  
LSP: Leucocitos de sangre periférica  
LTR: Repeticiones de terminación largas  
LVPR: Lentivirus de Pequeños Rumiantes  
M: Mastitis  
MA: Proteína de matriz  
MEX: México  
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad  
mM: mili Molar  
Ms: Membrana sinovial  
MV: Maedi visna  
MVV: Maedi visna virus  
*N: Asparagina*  
NC: Nucleocápside  
ng: Nanogramos  
nm: Nanometro

NOR: Noruega  
°C: Grados celsius  
OIE: Organización mundial de sanidad animal  
ORF: Marco abierto de lectura (por sus siglas en inglés)  
*P: Prolina*  
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés)  
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa  
Plm: Pulmón  
POR: Portugal  
PR: Enzimas proteasa  
Pr55gag: Proteína precursora de Gag  
Qro.: Queretaro  
*R: Arginina*  
R: Respiratorio  
RE: Retículo endoplásmico  
RIPA: Radioinmunoprecipitación  
RNasa H: ribonucleasa H  
Rño: Riñón  
rpm: revoluciones por minuto  
RT: Enzima transcriptasa inversa  
*S: serina*  
SDHA: Succinato deshidrogenasa sub unidad A  
Sin.: Sinaloa  
SIV: Virus de inmunodeficiencia de los simios  
SLAM: Molécula de activación linfocítica de señalización del receptor (por sus siglas en inglés)  
SOA: Sudáfrica  
Son.: Sonora  
SP1: péptido espaciador  
SPA: España  
Ssx: asintomático  
SU: Proteína de superficie  
SWI: Suiza  
*T: Treonina*  
TAE: Tris, acetato y EDTA  
TLR: Receptor tipo Toll  
TM: Transmembrana  
TMEM154: Proteína transmembrana 154  
tRNAlys: ARN de transferencia-lisina  
UBIPRO: Unidad de Biotecnología y Prototipos  
USA: Estados Unidos de América  
V1: Región variable 1

V3: Región variable 3  
V4: Región variable 4  
V5: Región variable 5  
VDC: VIRUS DEL DISTEMPER CANINO  
VDN: Virus de enfermedad de Newcastle  
Ver.: Veracruz  
*vif*: Factor de infectividad viral  
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana  
*vpr-like*: Parecido a proteína viral R  
WB: Western Blot  
*Y*: *Tirosina*  
μg: Microgramo  
μL: Microlitros

## 10. REFERENCIAS

1. Greenlandb T, Badiolac J, Harkissd G, et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research* 2004;35:257–274.
2. Christodouloupoulos G. Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Ruminant Research* 2006;62:47–53.
3. Martínez-Navalón B, Peris C, Gómez EA, et al. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Veterinary Journal* 2013;197:311–317.
4. Trigo Tavera FJ. La Artritis encefalitis caprina. In: *Ciencia Veterinaria*. Vol 5.; 1991:49–66.
5. Baba SS, Fotabe AI, Baba MM, et al. Preliminary survey for antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) using recombinant GAG proteins: Studies among small ruminant populations in north-eastern Nigeria. *Small Ruminant Research* 2000;37:137–140.
6. Nord K, Holstad G, Eik L, et al. Control of caprine arthritis-encephalitis virus and corynebacterium pseudotuberculosis infection in a Norwegian goat herd. *Acta Vet Scand* 1998;39:109.
7. Ramírez H, Glaria I, Andrés X de, et al. Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *Veterinary Journal* 2011;190:169–172.
8. Días AE, Romero FA, Navarrete VJ. *Manual para el Diagnóstico de Enfermedades en Ovinos y Caprinos en México*. 2005; 2005.
9. Torres Duran YV. *Cinética de la expresión de proteínas de Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR)*. 2011.
10. Glaria IRRA. *Base genética del tropismo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3*. 2015.
11. Baquero N. *Análisis epidemiológico de las infecciones por lentivirus de pequeños rumiantes ( SRLVs ) y su contribución al estudio de la patogenia por estos virus*. 2013:140.

12. Gjerset B, Jonassen CM, Rimstad E. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Virus Res* 2007;125:153–161.
13. Minguijón E, Reina R, Pérez M, et al. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology* 2015;1974.
14. Outram GW. Slow virus diseases of animals and man. 1976;2:325–357.
15. Martínez Rodríguez HA, Ramírez Álvarez H, Tórtora Pérez J, et al. Effect of the caprine arthritis encephalitis virus in the reproductive system of male goats. *Veterinaria Mexico* 2005;36:159–176.
16. Souza KC de, Pinheiro RR, Santos DO, et al. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research* 2013;109:193–198.
17. Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, et al. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Research* 2002;87:69–77.
18. Fieni F, Rowe J, Van Hoosear K, 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.
19. Blacklaws BA, Berriatua E, Torsteinsdottir S, et al. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 2004;101:199–208.
20. Rowe JD, East NE. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* 1997;13:35–53.
21. da Cruz JCM, Singh DK, Lamara A, et al. Small ruminant lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range. *Viruses* 2013;5:1867–1884.
22. OIE. 2.7.3/4: Artritis-Encefalitis caprina y Maedi-visna. In: *Manual de la OIE sobre animales terrestres.*; 2008:1–10.
23. Brinkhof JMA, Houwers DJ, Moll L, et al. Diagnostic performance of ELISA and PCR in

identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Veterinary Microbiology* 2010;142:193–198.

24. De Andrés D, Klein D, Watt NJ, et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 2005;107:49–62.

25. Chebloune Y, Sheffer D, Karr BM, et al. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* 1996;222:21–30.

26. Sanna E, Sanna MP, Vitali CG, et al. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Journal of Comparative Pathology* 1999;121:271–276.

27. Storset AK, Teig A, Rimstad E. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus RNA in macrophages by in situ hybridization using fluorescein-labelled single-stranded RNA probes. *Veterinary Microbiology* 1996;52:25–35.

28. Herrmann-hoesing LM. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. 2010;855:843–855.

29. Leginagoikoa de la Arena I. Epidemiología y Diagnostico de la infección por el Virus Maedi Visna en Diferentes Sistemas de Explotación Ovinos Españoles. 2010.

30. Klein D, Watt NJ, Berriatua E, et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. 2005;107:49–62.

31. Blacklaws BA. Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Small ruminant lentiviruses : Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. “Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases” 2012;35:259–269.

32. Álvarez V, Daltabuit-Test M, Arranz J, et al. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Research in Veterinary Science* 2006;80:226–234.

33. Brinkhof JMA, Moll L, van Maanen C, et al. Use of serology and polymerase chain reaction for the rapid eradication of small ruminant lentivirus infections from a sheep flock: A case report. *Research in Veterinary Science* 2010;88:41–43.

34. Anon. User:Splette - Wikimedia Commons. Available at: <https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Splette>. Accessed June 4, 2017.
35. Ramirez H, Reina R, Amorena B, et al. Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses* 2013;5:1175–1207.
36. Guðmundsdóttir EP. Cell tropism of maedi-visna virus. 2010.
37. Pépin M, Vitu C, Russo P, et al. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. [Vet Res. 1998 May-Aug] - PubMed result. *Veterinary research* 1998;29:341–67.
38. Chiu TK, Davies DR. Structure and Function of HIV-1 Integrase. 2004:965–977.
39. Arcila Gerardo. Estudio del Virus de Artritis Encefalitis Caprina en Glándulas Accesorias del Aparato Reproductor de Machos Caprinos. 2010.
40. Bouzar BA, Morin T, Legras C, et al. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis Encephalitis Virus Genomes Encode a Vpr-Like but No Tat Protein. 2003;77:9632–9638.
41. Workman AM, Dickey AM, Heaton MP, et al. Complete Genome Sequences of Two Genotype A2 Small Ruminant Lentiviruses Isolated from Infected U.S. Sheep. 2017:3–5.
42. Crespo H, Jauregui P, Glaria I, et al. Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis. *Veterinary Research* 2012;43:1–6.
43. Clements JE, Christine Zink M. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinical Microbiology Reviews* 1996;9:100–117.
44. Narayan O, Clements JE. Biology and pathogenesis of Lentiviruses. *Acta Tropica* 1989;70:375–394.
45. Haziza B, Chauvin J, Gluschankof P, et al. Caprine Arthritis Encephalitis Virus : Evidence for a B / D-Type Assembly Pathway in a C-Type Lentivirus Replication. 2001;445:434–445.
46. Þórunn GE. Cell tropism of maedi-visna virus.pdf. Skemman 2010.
47. Hellmund C, Lever AML. Coordination of genomic RNA packaging with viral assembly in HIV-1. *Viruses* 2016;8:1–13.
48. Bouzar BA, Rea A, Hoc-Villet S, et al. Activation/proliferation and apoptosis of bystander goat lymphocytes induced by a macrophage-tropic Chimeric Caprine Arthritis Encephalitis Virus Expressing SIV Nef. *Motor Control* 2009;27:590–609.

49. Domingo E, Baranowski E, Nunez JI, et al. Cuasiespecies y evolución molecular de virus cuasiespecies e impacto de esta estructura poblacional de los virus RNA. *Rev sci tech Off int Epiz* 2000;19:55–63.
50. Erhouma E, Guiguen F, Chebloune Y, et al. Small ruminant lentivirus proviral sequences from wild ibexes in contact with domestic goats. *Journal of General Virology* 2008;89:1478–1484.
51. Shah C, Boni J, Huder JB, 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.
52. Ojosnegros S, Perales C, Mas A, et al. Quasispecies as a matter of fact: Viruses and beyond. *Virus Research* 2011;162:203–215.
53. Catástrofes EY. Cuasiespecies víricas. vida, evolución y catástrofes. 2004;XII:39–59.
54. Moreno-valencia Y, Álvarez-garcía LX, Vázquez-pérez JA. Factores celulares que restringen la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana ( VIH ): nuevas esperanzas en la terapia antirretroviral. 2014;66:359–368.
55. Andrésdóttir V. Evidence for recombination in the envelope gene of maedi-visna virus. *Virus Genes* 2003;27:5–9.
56. Andrésdóttir V, Skraban R, Lutley R, et al. Selection of antigenic variants in maedi – visna virus infection. *Journal of General Virology* 2002:2543–2551.
57. Pérez M, Biescas E, Andrés X De, et al. Visna / maedi virus serology in sheep : Survey , risk factors and implementation of a successful control programme in Aragón ( Spain ). *THE VETERINARY JOURNAL* 2009.
58. Glaria I, Reina R, Ramírez H, et al. Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Veterinary Microbiology* 2012;155:137–146.
59. Korber BT, Kunstman KJ, Patterson BK, et al. Genetic differences between blood- and brain-derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1-infected

patients: evidence of conserved elements in the V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences. *J Virol* 1994;68:7467–7481.

60. Pisoni G, Moroni P, Turin L, et al. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology* 2007;369:119–130.

61. Stasolla C, Loukanina N, Ashihara H, et al. Pyrimidine nucleotide and nucleic acid synthesis in embryos and megagametophytes of white spruce (*Picea glauca*) during germination. *Physiologia Plantarum* 2002;115:155–165.

62. Turelli P, Guiguen F, Mornex JF, et al. dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions. *Journal of virology* 1997;71:4522–4530.

63. Wain-Hobson S, Sonigo P, GUYADER M, et al. Erratic G A hypermutation within a complete caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) provirus.pdf.

64. Vranken WF, Fant F, Budesinsky M, et al. Conformational model for the consensus V3 loop of the envelope protein gp120 of HIV-1 in a 20 % trifluoroethanol / water solution. *Biochem* 2001;2628:2620–2628.

65. Granados-González V, Piedrahita LD, Martínez M, et al. Papel del dominio V1/V2 de la glucoproteína 120 del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 en la inducción de anticuerpos neutralizantes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2009;27:523–530.

66. Zolla-pazner S. IDENTIFYING EPITOPES OF HIV-1 THAT INDUCE PROTECTIVE ANTIBODIES. 2004;4.

67. Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, et al. Structural dynamics of HIV-1 envelope GP120 outer domain with V3 loop. *PLoS ONE* 2012;7:4–7.

68. Pinghuang L, Hudson LC, Tompkins MB, et al. Compartmentalization and evolution of feline immunodeficiency virus between the central nervous system and periphery following intracerebroventricular or systemic inoculation. 2006;12:307–321.

69. Chen MF, Westmoreland S, Ryzhova E V, et al. Simian immunodeficiency virus envelope compartmentalizes in brain regions independent of neuropathology. *J*

Neurovirol 2006;12:73–89.

70. Liao P, Guo L, Wen Y, et al. Phylogenetic features of hemagglutinin gene in canine distemper virus strains from different genetic lineages. 2015;8:6607–6612.

71. Munir M, Abbas M, Khan MT, et al. Genomic and biological characterization of a velogenic Newcastle disease virus isolated from a healthy backyard poultry flock in 2010. *Virology Journal* 2012;9:46.

72. Collins MS, Bashiruddin JB, Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Archives of Virology* 1993;128:363–370.

73. Pal M, Dasgupta S. The Nature of the Turn in Omega Loops of Proteins. 2003;606:591–606.

74. Papaleo E, Saladino G, Lambrughini M, et al. The Role of Protein Loops and Linkers in Conformational Dynamics and Allostery. 2016.

75. Steckbeck JD, Kuhlmann A, Montelaro RC. Structural and Functional Comparisons of Retroviral Envelope Protein C-Terminal Domains: Still Much to Learn. 2014:284–300.

76. Britain G, Medicine C, Biology M, et al. Biology and Pathogenesis of Lentiviruses. 2016:1617–1639.

77. Stonos N, Wootton SK, Karrow N. Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral Infections. 2014:3311–3333.

78. Gorodezky C, Pérez VF, SD. G, et al. Manual de procedimientos Serológicos y Celulares de Inmunogenética. México; 2008.

79. Huang J, Sun Y, Liu Y, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA. *Archives of Virology* 2012;157:1463–1469.

80. Glaria I, Reina R, Crespo H, et al. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Veterinary Microbiology* 2009;138:156–162.

81. Reina R, Bertolotti L, Dei Giudici S, et al. Small ruminant lentivirus genotype E is

- widespread in Sarda goat. *Veterinary Microbiology* 2010;144:24–31.
82. Sargan DR, Bennet ID, Cousens C, et al. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus David. *General Virology* 1991;72:1893–1903.
83. Sonigo P, Alizon M, Staskus K, et al. Nucleotide Sequence of the Visna Lentivirus : Relationship to the AIDS Virus. 1985;42:369–382.
84. Braun MJ, Clements JE, Gonda M a. The visna virus genome: evidence for a hypervariable site in the env gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. *Journal of virology* 1987;61:4046–4054.
85. Staskus KA, Retzel EF, Lewis ED, et al. Isolation of replication-competent molecular clones of visna virus. *Virology* 1991;181:228–240.
86. Bertolotti L, Mazzei M, Puggioni G, et al. Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the mediterranean basin. *Journal of General Virology* 2011;92:1923–1929.
87. Gjerset B, Storset AK, Rimstad E. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: Characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *Journal of General Virology* 2006;87:573–580.
88. Barros SC, Ramos F, Duarte M, et al. Genomic characterization of a slow/low maedi visna virus. *Virus Genes* 2004;29:199–210.
89. Querat G, Audoly G, Sonigo P, et al. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology* 1990;175:434–447.
90. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001;17:754–755.
91. Kryazhimskiy S, Plotkin JB. The population genetics of dN/dS. *PLoS Genetics* 2008;4.
92. Korber B, Myers G. Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness. *AIDS research and human retroviruses* 1992;8:1549–60.
93. Cinthya Isabel SB. Diagnóstico serológico de Lentivirus de Pequeños Rumiantes en rebaños caprinos del Estado de Guanajuato. 2016.

94. Lazcano MA. Detección de anticuerpos en sementales caprinos y ovinos a Lentivirus de Pequeños Rumiantes, en 7 estados del país. 2013.
95. Siliceo IJ. Evaluacion de la proteina recombinante p16 del LVPR para el desarrollo de la pba de ELISAi .pdf. 2014:45.
96. Sánchez JH, Martínez HA, García MM, et al. The presence of small ruminant lentiviruses in Mexican Pelibuey sheep. *Theriogenology* 2016;86:1953–1957.e1.
97. Santry LA, de Jong J, Gold AC, et al. Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario, Canada. *Virus Research* 2013;175:30–44.
98. Ramírez H, Reina R, Bertolotti L, et al. Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Veterinary Research* 2012;8:8.
99. Valas S, Benoit C, Baudry C, et al. Variability and Immunogenicity of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Surface Glycoprotein. 2000;74:6178–6185.
100. Karanikolaou K, Angelopoulou K, Papanastasopoulou M, et al. Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. *Small Ruminant Research* 2005;58:181–187.
101. Donaldson YK, Bell JE, Holmes EC, et al. In Vivo Distribution and Cytopathology of Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Showing Restricted Sequence Variability in the V3 Loop. 1994;68:5991–6005.
102. Leroux C, Cruz JCM, Mornex J-F. SRLVs: a genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. *Current HIV research* 2010;8:94–100.
103. De Souza TS, Pinheiro RR, Costa JN, et al. Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015;46:867–874.
104. Valas S, Benoit C, Baudry C, et al. Variability and Immunogenicity of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Surface Glycoprotein. 2000;74:6178–6185.
105. Skraban R, Matthíasdóttir S, Torsteinsdóttir S, et al. Naturally occurring mutations

- within 39 amino acids in the envelope glycoprotein of maedi-visna virus alter the neutralization phenotype. *Journal of virology* 1999;73:8064–8072.
106. Rizzo G, Forti K, Serroni A, et al. Single N-glycosylation site of bovine leukemia virus SU is involved in conformation and viral escape. *Veterinary Microbiology* 2016;197:21–26.
107. Sakaguchi T, Toyoda T, Gotoh B, et al. Newcastle disease virus evolution. I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* 1989;169:260–272.
108. Korber BTM, Kunstman KJ, Patterson BK, et al. Genetic Differences between Blood- and Brain-Derived Viral Sequences from Human Immunodeficiency Virus Type 1- Infected Patients : Evidence of Conserved Elements in the V3 Region of the Envelope Protein of Brain-Derived Sequences. 1994;68:7467–7481.
109. Holman AG, Gabuzda D. A Machine Learning Approach for Identifying Amino Acid Signatures in the HIV Env Gene Predictive of Dementia. *PLoS ONE* 2012;7.
110. Pillai SK, Pond SLK, Liu Y, et al. Genetic attributes of cerebrospinal fluid-derived HIV-1 env. *Brain* 2006;129:1872–1883.
111. Mikula I, Bhide M, Pastorekova S, et al. Veterinary Immunology and Immunopathology Characterization of ovine TLR7 and TLR8 protein coding regions , detection of mutations and Maedi Visna virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2010;138:51–59.
112. Larruskain A, Jugo BM. Retroviral infections in sheep and goats: Small ruminant lentiviruses and host interaction. *Viruses* 2013;5:2043–2061.
113. Van Manen D, Rits MAN, Beugeling C, et al. The effect of Trim5 polymorphisms on the clinical course of HIV-1 infection. *PLoS Pathogens* 2008;4.
114. Bagnicka E. Impaired Expression of Cytokines as a Result of Viral Infections with an Emphasis on Small Ruminant Lentivirus Infection in Goats. 2016.
115. Herrmann-Hoesing LM, Noh SM, White SN, et al. Peripheral ovine progressive pneumonia provirus levels correlate with and predict histological tissue lesion severity in Naturally Infected Sheep. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009;16:551–557.

116. Ravazzolo AP, Nenci C, Vogt HR, et al. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 2006;350:116–127.
117. Crespo H, Bertolotti L, Proffitti M, et al. Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Veterinary Microbiology* 2016;192:152–162.
118. Wei XM, Xu HF, Cheng X Di, et al. Position 22 of the V3 loop is associated with HIV infectivity. *Archives of Virology* 2017;162:637–643.
119. Nolan KM, Jordan APO, Hoxie JA. Effects of Partial Deletions within the Human Immunodeficiency Virus Type 1 V3 Loop on Coreceptor Tropism and Sensitivity to Entry Inhibitors. *Journal of Virology* 2008;82:664–673.
120. Korber BT, Farber RM, Wolpert DH, et al. Covariation of mutations in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein: an information theoretic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:7176–7180.
121. Gu R, Westervelt P, Ratner LEE. Role of HIV-1 Envelope V3 Loop Cleavage in Cell Tropism. 1993;9:1007–1015.
122. Nolan KM, Del Prete GQ, Jordan APO, et al. Characterization of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 V3 Deletion Mutation That Confers Resistance to CCR5 Inhibitors and the Ability To Use Aplaviroc-Bound Receptor. *Journal of Virology* 2009;83:3798–3809.
123. Kuiken CL, Zwart G, Baan E, et al. Increasing antigenic and genetic diversity of the V3 variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in the course of the AIDS epidemic. 1993;90:9061–9065.
124. Chen H, Wood C, Petito CK. Comparisons of HIV-1 viral sequences in brain, choroid plexus and spleen: potential role of choroid plexus in the pathogenesis of HIV encephalitis. *J Neurovirol* 2000;6:498–506.
125. Hötzel I, Kumpula-McWhirter N, Cheevers WP. Rapid evolution of two discrete regions of the caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface glycoprotein during

persistent infection. *Virus Research* 2002;84:17–25.

126. Cashin K, Sterjovski J, Harvey KL, et al. Covariance of charged amino acids at positions 322 and 440 of HIV-1 Env contributes to coreceptor specificity of subtype B viruses, and can be used to improve the performance of V3 sequence-based coreceptor usage prediction algorithms. *PLoS ONE* 2014;9.

127. Hartley O, Klasse PERJ, Sattentau QJ, et al. Review V3: HIV's Switch-Hitter. *2005;21:171–189.*

128. MacLachlan J, Dubovi E. *Fenner's Veterinary Virology*. Fourth. New York, USA; 2011.

## 11. ANEXO 1

### 11.1 SOLUCIONES

#### 11.1.1 SOLUCIÓN DE LISIS 1

- $\text{MgCl}_2$  5mM cbp 1L  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

Peso molecular de  $\text{MgCl}_2$ : 95.21 g/mol /1,000 : 0.09521 g/mM

0.09521 g/mol X 5 : 0.476g  $\text{MgCl}_2$

#### 11.1.2 SOLUCIÓN DE LISIS 2

- $\text{MgCl}_2$  5mM cbp 1L  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

Peso Molecular de  $\text{MgCl}_2$ : 95.21 g/mol /1,000 : 0.09521 g/mM

0.09521 g/mol X 5 : 0.476g  $\text{MgCl}_2$

- Nonidet (NP-40) al 0.1% cbp 1L  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

1mL Nonidet (NP-40) 999 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

#### 11.1.3 SOLUCIÓN SALINA TAMPONADA DE FOSFATOS (PBS)

- Se vierte un sobre (Phosphate buffered saline; P3813 SIGMA® poder, USA) Sobre para preparar 1L con un pH 7.4 en un matraz con 1L de agua destilada.

#### 11.1.4 TAE 50X PARA 1L

Tris Acetato:

- 242 g tris base (pM 121.1)
- 57.1 mL ácido acético glacial
- 10 mL 0.5M EDTA (pM 372.24) pH 8.0

cpb 1L

TAE 1X para 1L

20 mL de TAE 50X en 980 mL de agua destilada.

## 11.2 SEPARACIÓN DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

1. Las células blancas se recuperaron con pipeta Pasteur y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL.
2. Agregar solución de lisis I cbp 10 mL y homogenizar.
3. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 min y decantar el sobrenadante.
4. Agregar solución de lisis II cbp 10 mL y homogenizar.
5. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 min y decantar el sobrenadante.
6. Lavar con PBS a un volumen de 7mL.
7. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 min y decantar el sobrenadante.
8. Recuperar el paquete de células con micropipeta a un volumen de 300  $\mu$ L de PBS y guardar a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## 12. ANEXO 2

### 12.1 MECANISMO DEL COMPLEJO DE RETROTRANSCRIPCIÓN

1. La síntesis de ADN de la cadena (-) comienza en el extremo 5' del ARN viral y termina en la región R, produciendo ADNss-.
2. La RNasa H degrada el ARN del híbrido de ARN-ADN, dando como resultado un producto de ADN de cadena sencilla.
3. El ADN monocatenario se hibrida con la región R en el extremo 3' del ARN. Esta región puede estar en el genoma ARN (salto de transferencia). Esta transferencia está mediada por secuencias idénticas llamadas secuencias repetidas (R) en los extremos 5' y 3' del ARN genómico. Este salto permite que la RT continúe la síntesis de ADN en la plantilla de ARN.
4. Cuando la RT transcribe la región PPT en el extremo 3' del ARN genómico, el ARN-ADN híbrido escapa a la digestión de la RNasa H. Este ARN sirve como cebador para la síntesis de cadenas (+). Utilizando la cadena de ADN (-) como una plantilla.
5. La RT continúa la síntesis de ADNc y la RNasa H continúa eliminando el ARN del híbrido ARN-ADN.
6. La RNasa H de algunos retrovirus deja cebadores adicionales para la síntesis del ADN de la hebra (+).
7. Cuando la síntesis del ADNss se termina y después de la síntesis de la cadena + se produce la actividad RNasa H de la RT elimina los cebadores tRNA y PPT.
8. La eliminación del cebador tRNA expone la secuencia PBS del ADN (+). Apareando a su complemento en el ADN de la cadena (-).
9. La transferencia de la segunda cadena.
10. Se forma ADN intermediario circular. La reparación con enzimas del huésped puede producir un producto sin salida, una molécula de ADN circular con una sola LTR. Se produce una molécula lineal con dos LTR.

11. La reparación de las discontinuidades en la cadena (+) está mediada por enzimas del huésped. <sup>128</sup>

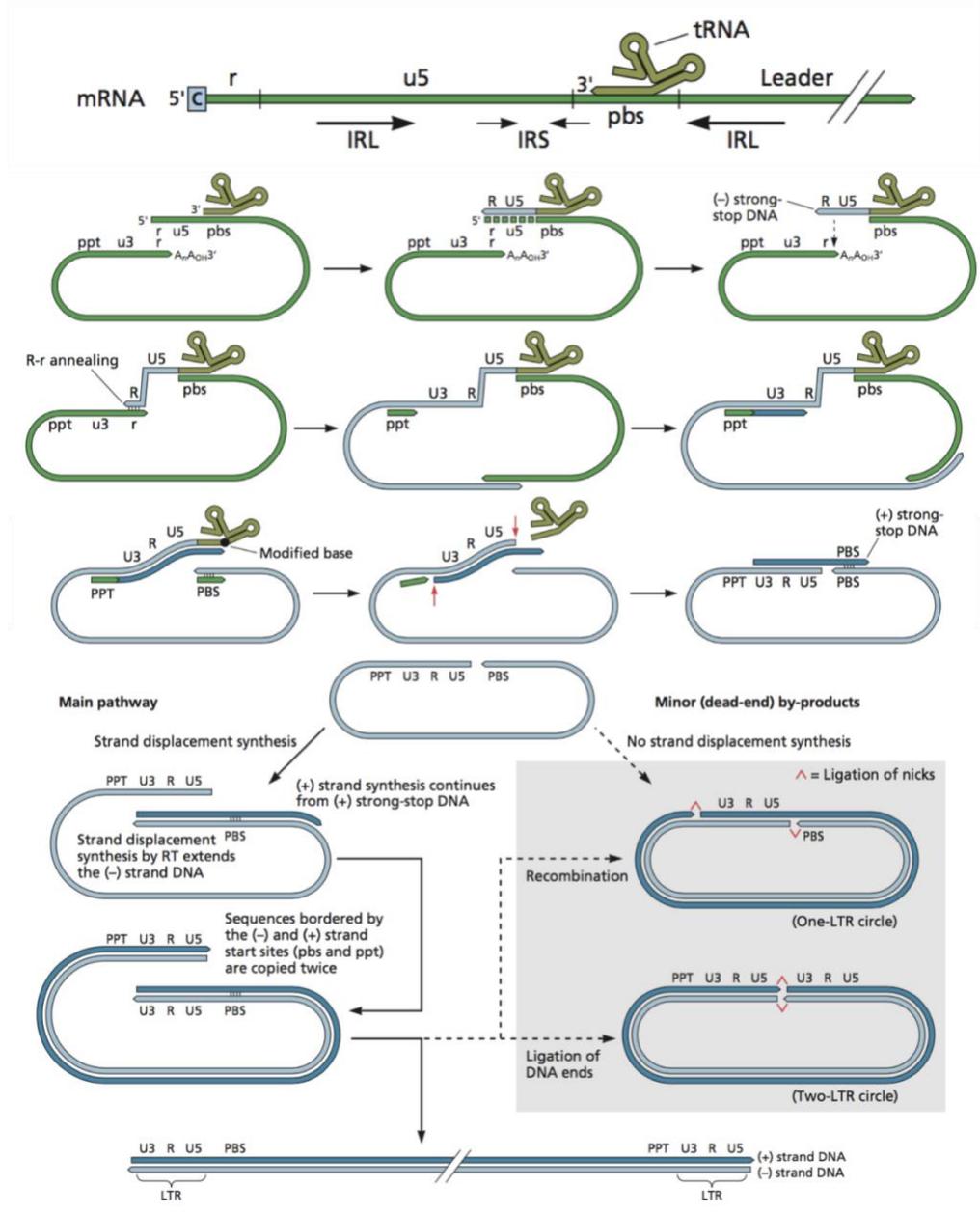


Figura 45: Mecanismo del complejo de retrotranscripción

### 13. APÉNDICE 1

Cuadro 16: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR con una técnica de ELISA competitiva por Estado de la República y especie.

ESTADO	CAPRINOS		OVINOS		CAPRINOS		OVINOS		TOTAL
	-	+	-	+	% de Negativos	% de Positivos	% de Negativos	% de Positivos	
B.C.S.	0	2	1	9	0	0.8	0.4	3.6	12
Coah.	30	10	0	0	12.1	4.0	0	0	40
Dgo.	0	-	1	0	0	0	0.4	0	1
Edo. Méx.	0	16	-	63	0	6.5	0	25.4	79
Hgo.	0	0	-	9	0	0.0	0	3.6	9
Gto.	0	34	0	0	0	13.7	0	0	34
Qro.	0	15	0	0	0	6.0	0	0	15
Sin.	0	5	0	0	0	2.0	0	0	5
Son.	0	19	0	14	0	7.7	0	5.6	33
Ver.	1	11	-	8	0.4	4.4	0	3.2	20
TOTAL	31	112	2	103	12.5	44.2	0.8	41.5	248

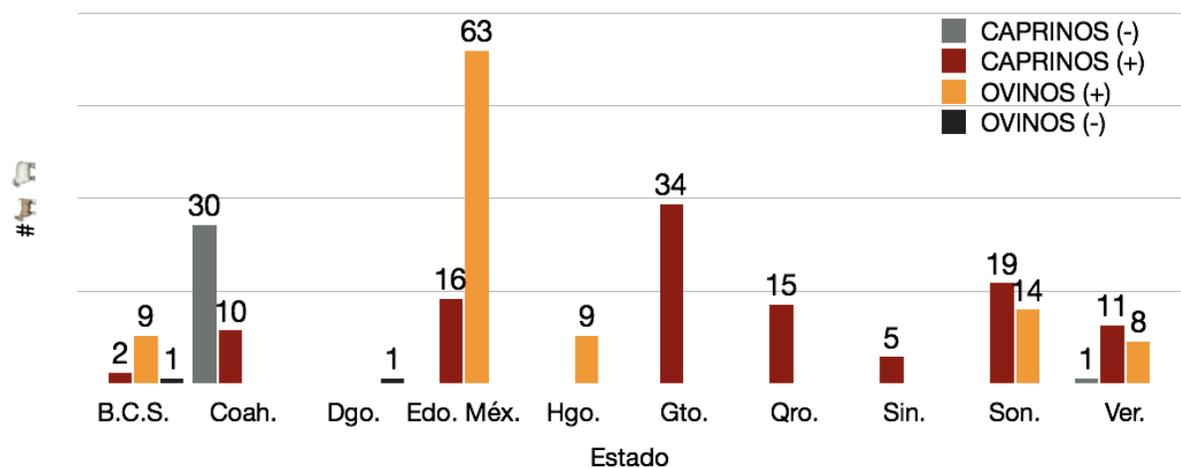


Figura 46: Muestras seropositivas a LVPR utilizando un ELISA competitivo comercial mostradas por especie y Estado del país.

Cuadro 17: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR por razas ovinas y expresados en porcentaje, evaluados con una técnica de ELISA competitivo

RAZA	NEGATIVO	POSITIVO	% de Negativos	% de Positivos	TOTAL
AWASSI	0	7	0	6.7	7
CHAROLLAIS	0	12	0	11.4	12
CRIOLLOS	0	2	0	1.9	2
CRUZA	1	22	1.0	21.0	23
DORPER	0	33	0	31.4	33
FRISSIAN	0	16	0	15.2	16
KATAHDIN	0	3	0	2.9	3
PELIBUEY	0	8	0	7.6	8
SIN DATOS	1	0	1.0	0.0	1
TOTAL	2	103	1.9	98.1	105

S/D : sin dato.

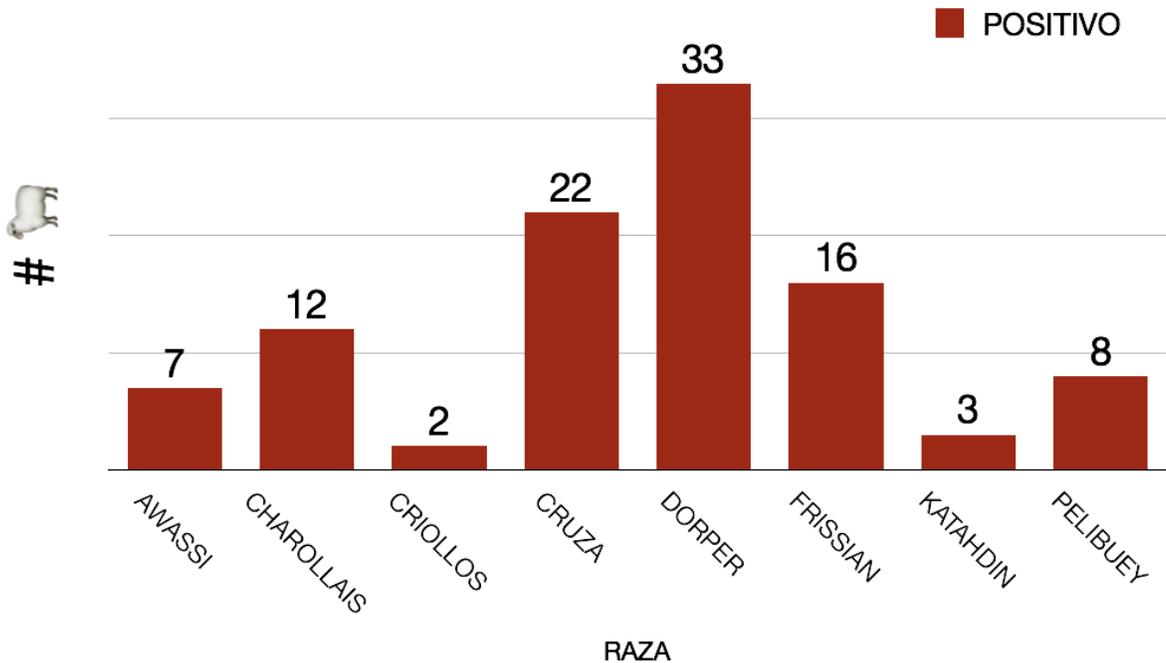


Figura 47: Gráfica de serología positiva a LVPR de ovinos por raza.

Cuadro 18: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR por razas caprinas y expresados en porcentaje, evaluados con una técnica de ELISA competitivo.

RAZA	NEGATIVOS	POSITIVO	% de Negativos	% de Positivos	TOTAL
Alpina Francesa	0	36	0	25.2	36
Boer	0	5	0	3.5	5
Criolla	30	10	21.0	7.0	40
Cruza	0	2	0.0	1.4	2
Nubia	0	3	0.0	2.1	3
Sin Dato	0	3	0.0	2.1	3
Sannen	1	45	0.7	31.5	46
Toggenburg	0	8	0.0	5.6	8
<b>TOTAL</b>	<b>31</b>	<b>112</b>	<b>21.7</b>	<b>78.3</b>	<b>143</b>

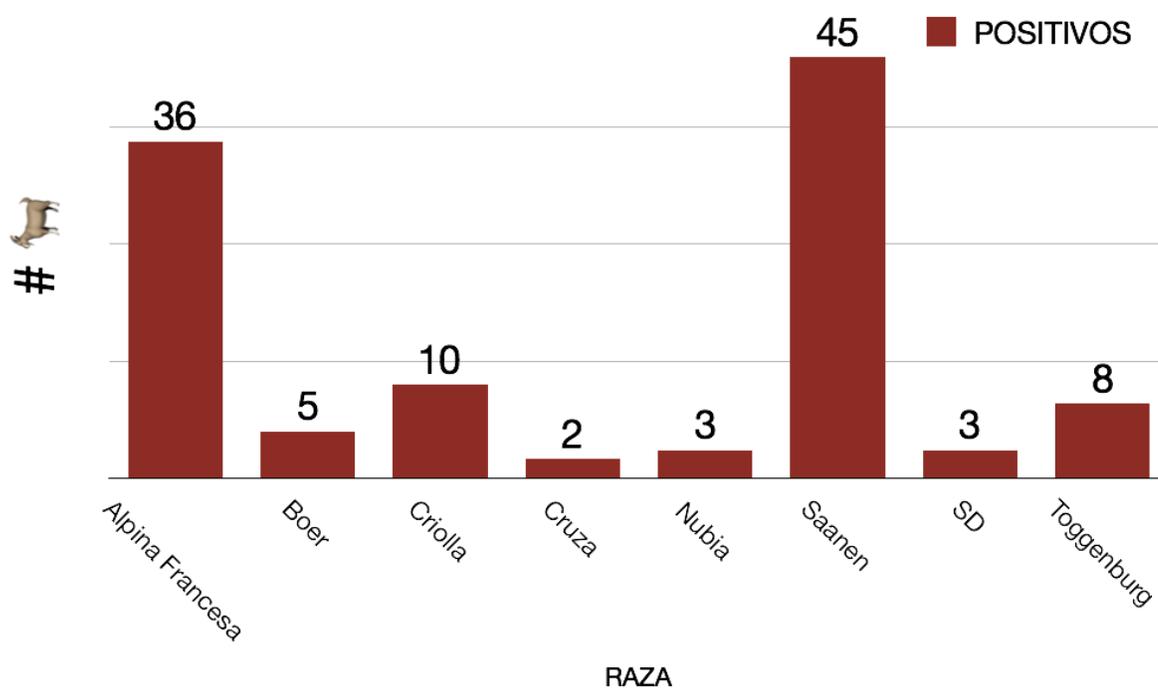


Figura 48: Gráfica de serología positiva a LVPR de caprinos por raza.

Cuadro 19: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR en ovinos y caprinos por sexo y expresado en porcentaje, evaluados con una técnica de ELISA competitivo.

ESPECIE	SEXO	NEGATIVO	POSITIVO	% de Negativos	% de Positivos	TOTAL
CAPRINOS	Hembra	27	107	10.9	43.1	134
	Macho	4	5	1.6	2.0	9
OVINOS	Hembra	2	65	0.8	26.2	67
	Sin dato	0	38	0.0	15.3	38
	TOTAL	33	215	13.3	86.7	248

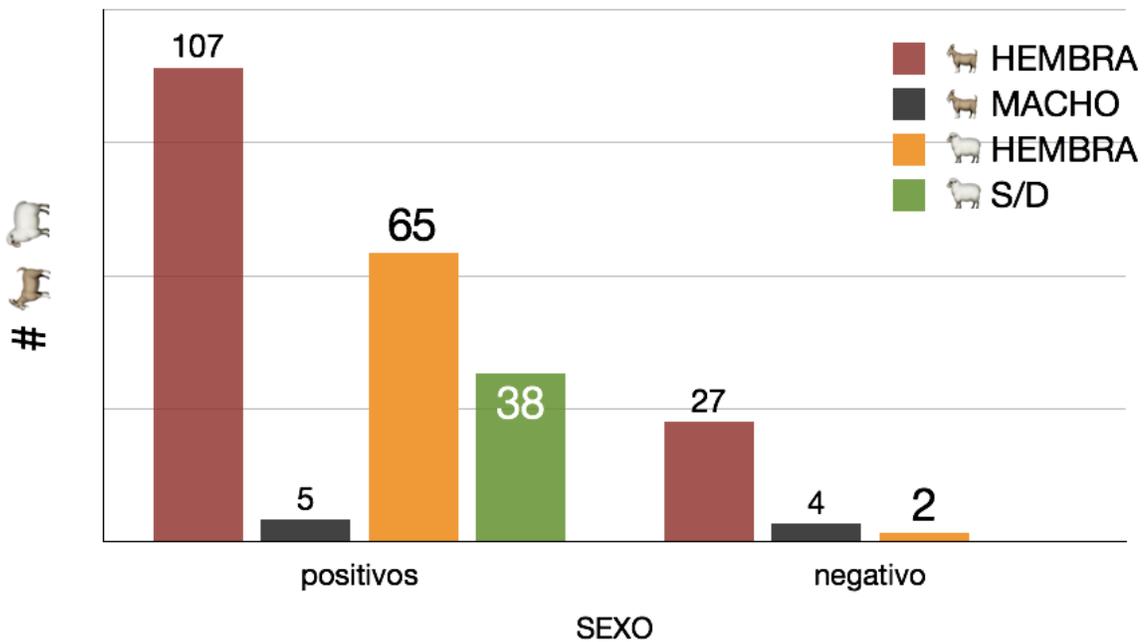


Figura 49: Gráfica de serología positiva a LVPR en ovinos y caprinos por sexo.

Cuadro 20: Resultados de la presencia de anticuerpos contra LVPR en ovinos y caprinos clasificados por edad y expresados en porcentaje, evaluados con una técnica de ELISA competitivo.

EDAD	CAPRINOS				OVINOS				TOTAL
	-	+	% de Negativos	% de Positivos	-	+	% de Negativos	% de Positivos	
1-2 AÑOS	1	5	0.4	2.0	0	2	0	0.8	8
2-3 AÑOS	1	30	0.4	12.1	1	15	0.4	6.0	47
MAS DE 3 AÑOS	9	70	3.6	28.2	1	14	0.4	5.6	94
Sin dato	20	7	8.1	2.8	0	72	0.0	29.0	99
TOTAL	31	112	12.5	45.2	2	103	0.8	41.5	248

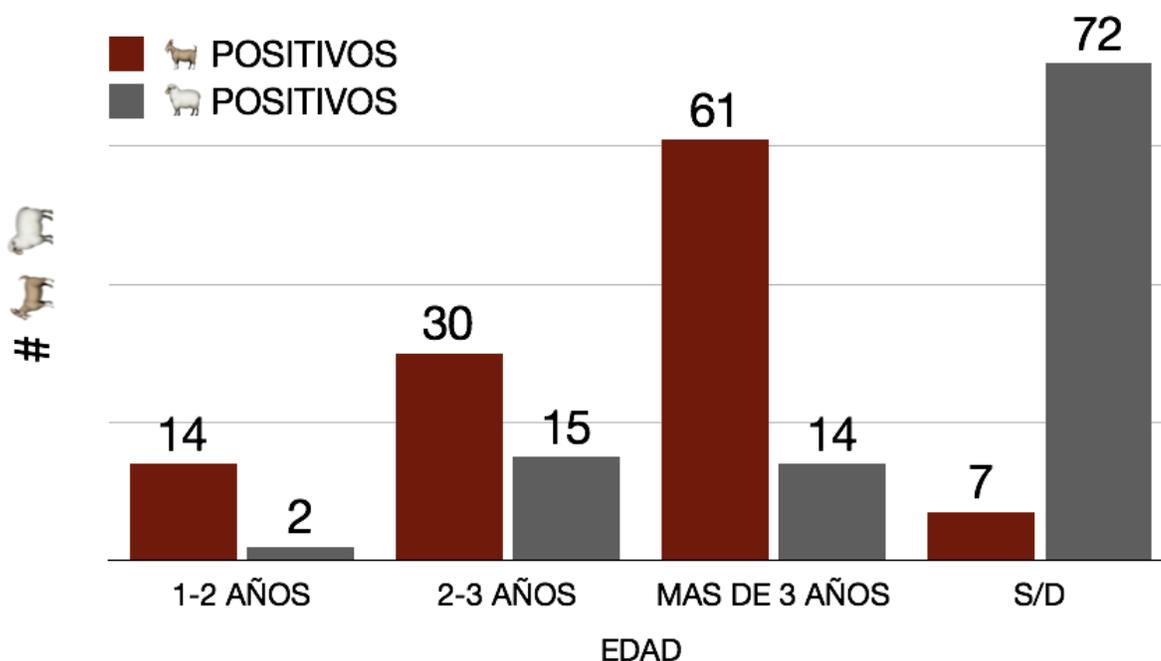


Figura 50. - Serología positiva a LVPR por edad en ovinos y caprinos.



Figura 52: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 59)

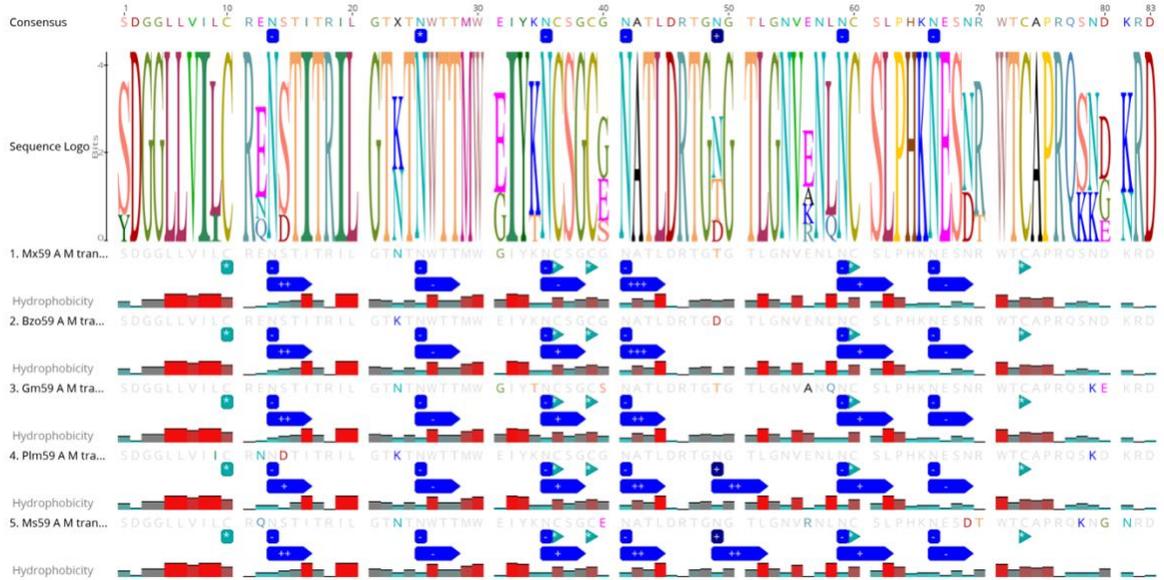


Figura 53: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 78)

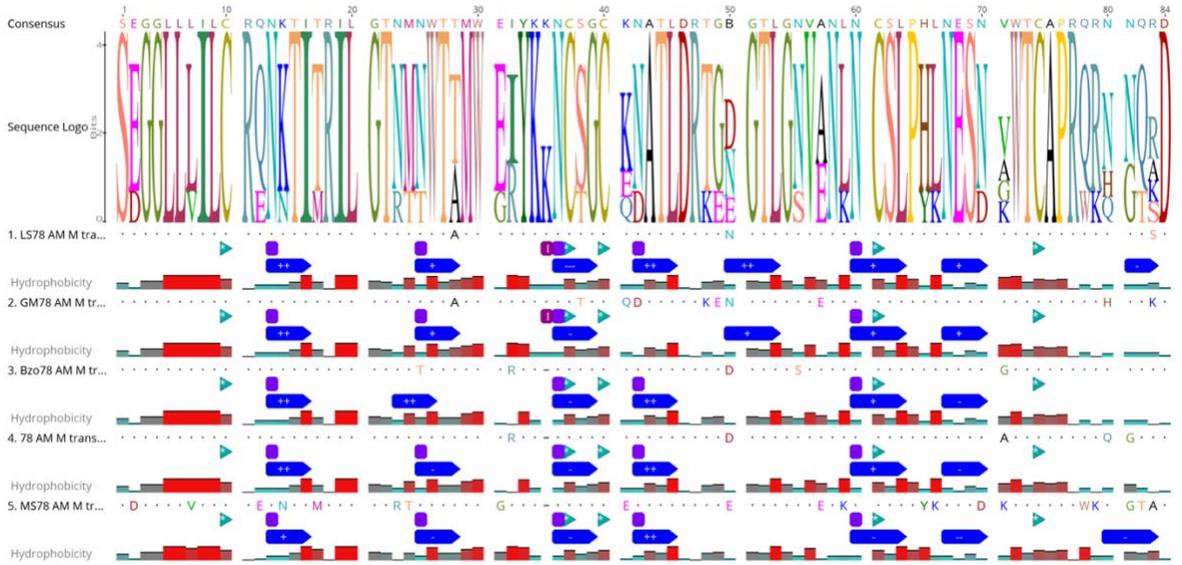


Figura 54: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 104)

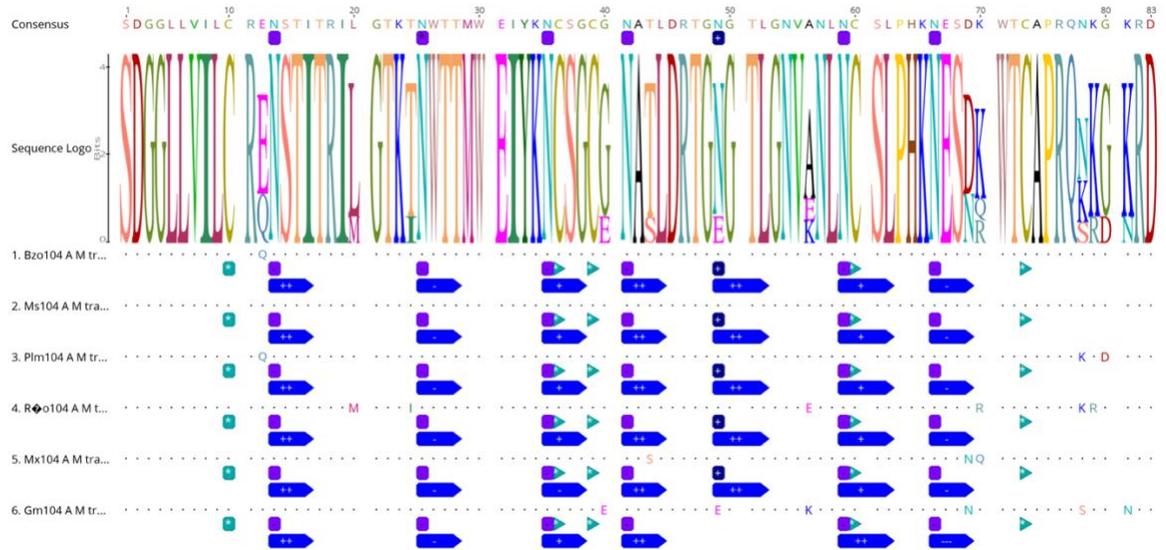


Figura 55: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 179)

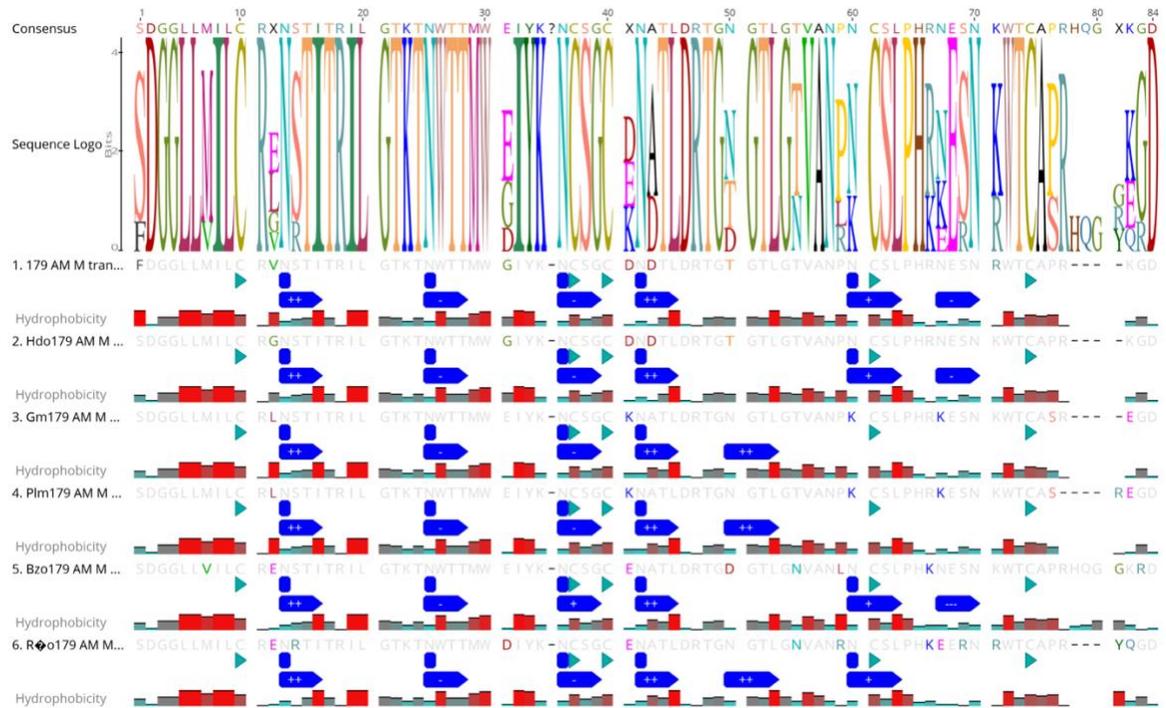


Figura 56: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 149)

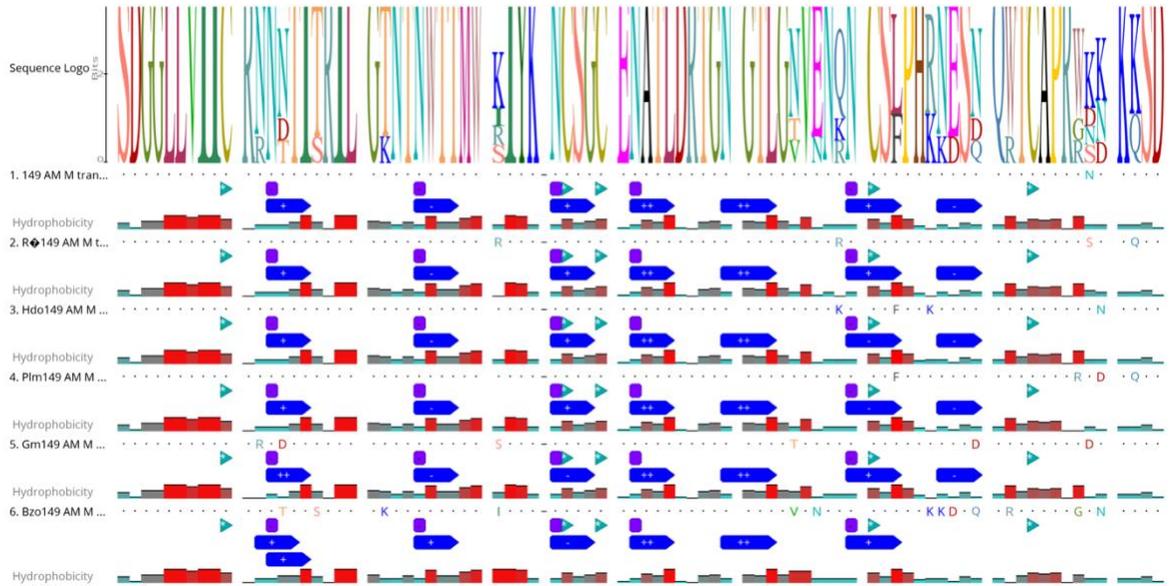


Figura 57: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 342)

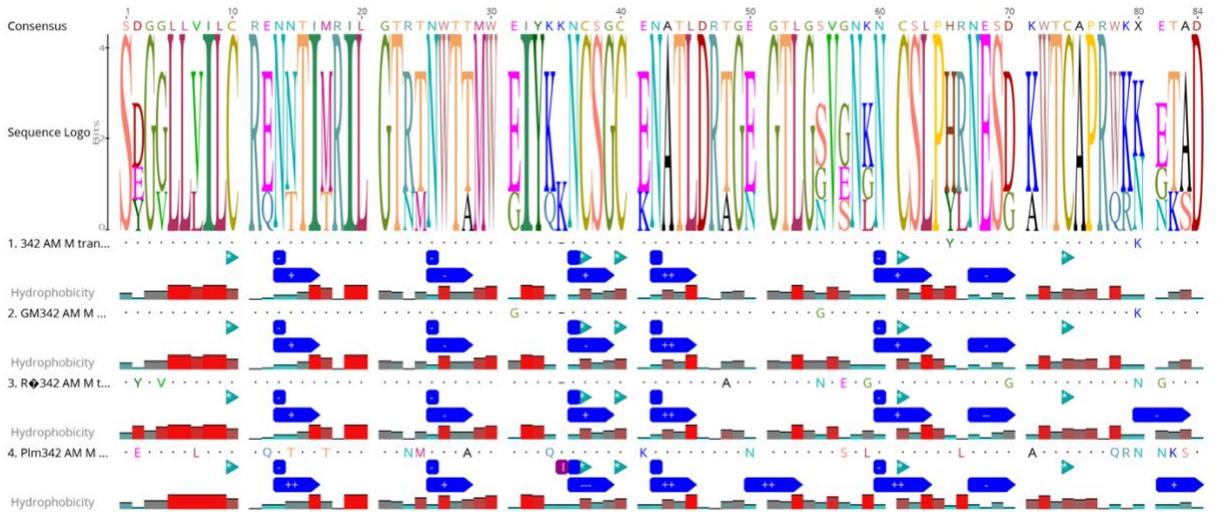


Figura 58: Alineamiento de aminoácidos de tejidos y sangre por animal (cabra no. 566)

