



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE INMUNOREACTIVOS (P16
RECOMBINANTE Y ANTISUERO) PARA SU EMPLEO EN EL
DIAGNÓSTICO DE LENTIVIRUS DE PEQUEÑOS RUMIANTES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: MÉDICA VETERINARIA

ZOOTECNISTA

MONROY DÍAZ LILIA DANIELA

ASESORES: DRA. M.C, MVZ. LAURA COBOS MARÍN, QBP. ERIK EDUARDO
NIETO PATLÁN, M.C, MVZ. ANA DELIA RODRÍGUEZ CORTEZ



MÉXICO, CDMX
CIUDAD UNIVERSITARIA 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres, hermanos y a mi pareja.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, amigos y pareja por apoyarme durante todo el proceso de este trabajo.

A mis tutores Dra. Laura Cobos Marín, M en C. Ana Delia Rodríguez Cortez y el QBP. Erick Nieto Patlán por sus conocimientos, su tiempo y su paciencia. Gracias por impulsarme a seguir adelante y a inculcarme su pasión por la ciencia.

A los proyectos PAPIIT y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los recursos ofrecidos para realizar esta tesis de licenciatura.

A todos los integrantes al Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ que contribuyeron para la realización de este trabajo.

Al Dr. Alejandro Benítez Guzmán y su equipo de trabajo que contribuyeron para la realización de este trabajo.

Al Dr. Alejandro de las Peñas Nava y a M en C. Norma Concepción Vázquez Franco por las cepas y la información donada.

Al Dr. Constantino López Macías, por la donación de las porinas Omp C y Omp F purificadas de *Salmonella entérica* serovar *Typhi*.

A la MVZ. Ariadna Verónica Ramos Rodríguez por asesorarme en la técnica de electroforesis y western blot.

A la M en C. Irlanda Judith Siliceo Cantero por la información donada.

Al M en C. Héctor Daniel Nájera Rivera por asesorarme en la purificación con la FPLC, en la elaboración de los geles de poliacrilamida y en proporcionarme los sueros de cabra positivos y negativos.

A la MVZ. EDV. Liliana M. Valdés Vázquez por la ayuda técnica en la realización de este proyecto

A mi jurado que revisó y contribuyó en la mejoría de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de adquirir nuevos e infinitos conocimientos.

CONTENIDO

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
CONTENIDO	4
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	10
INTRODUCCIÓN.....	13
Lentivirus de pequeños rumiantes en cabras	14
Estructura y genoma	16
Ciclo de replicación	19
Transmisión	20
Patogenia y lesiones	21
Diagnóstico	22
Proteínas inmunodominantes y la proteína de matriz p16	25
Inmunoreactivos	26
Proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	26
Antisueros	28
Porinas Omp C y Omp F como adyuvantes	29
ANTECEDENTES	30
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS PARTICULARES	31
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
OBTENCIÓN DE BACTERIAS <i>ESCHERICHIA COLI</i> ROSETTA TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO PET24 QUE EXPRESA LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA P16 DE LVPR	31

Extracción del plásmido PET24 por lisis alcalina a partir de <i>Escherichia coli</i> BL21	31
Transformación de la <i>Escherichia coli</i> rosetta, con el plásmido PET24 por choque térmico	33
Sobreexpresión de proteína p16	33
Lisado de pellet bacteriano	33
AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS.	34
Extracción y amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína recombinante p16.	34
Secuenciación del producto de PCR de la proteína recombinante p16	35
ANTIGENICIDAD DE LA P16 RECOMBINANTE MEDIANTE LA PRUEBA DE WESTERN BLOT	36
Inducción de las bacterias recombinantes p16 por IPTG	36
SDS-PAGE y western blot antihistidina y con pool de sueros positivos y negativos de cabra	37
OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA P16 RECOMBINANTE	38
Determinación de la expresión de la proteína p16 purificada por el kit QIAprep Miniprep NI-NTA Spin Columns a través de SDS-PAGE y Western blot antihistidina	38
Determinación de la expresión de la proteína p16 purificada por FPLC (Cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad) a través de SDS-PAGE y Western blot antihistidina	39
EVALUACIÓN DE LAS PORINAS COMO ADYUVANTE PARA OBTENER UN SUERO HIPERINMUNE ANTI P16 EN CONEJO.	39
Protocolo de inmunización para la obtención de sueros hiperinmunes anti P16 en conejo.	39
RESULTADOS	43
OBTENCIÓN DE BACTERIAS <i>ESCHERICHIA COLI ROSETTA</i> TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO PET24 QUE EXPRESA LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA P16 DE LVPR	43

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS.	44
Extracción y amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína recombinante p16.....	44
Secuenciación del producto de PCR de la proteína recombinante p16	45
ANTIGENICIDAD DE LA P16 RECOMBINANTE MEDIANTE LA PRUEBA DE WESTERN BLOT.....	46
Inducción de las bacterias recombinantes p16 por IPTG	46
OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA P16 RECOMBINANTE	47
Determinación de la expresión de la proteína p16 purificada por el kit QIAprep Miniprep NI-NTA Spin Columns a través de SDS-PAGE y Western blot antihistidina	47
Determinación de la expresión de la proteína p16 purificada por FPLC (Cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad) a través de SDS-PAGE y Western blot antihistidina.....	49
EVALUACIÓN DE LAS PORINAS COMO ADYUVANTE PARA OBTENER UN SUERO HIPERINMUNE ANTI P16 EN CONEJO.....	51
Obtención de sueros hiperinmunes anti P16 en conejo.	51
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIÓN.....	55
PROSPECTIVAS.....	55
ANEXOS.....	56
ANEXO 1	56
SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO	56
ANEXO 2.....	57
SOLUCIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR Master Mix (2x).....	57
ANEXO 3.....	57
SOLUCIONES PARA LA ELECTROFORESIS.....	57
ANEXO 4.....	59
SOLUCIONES PARA EL WESTERN BLOT.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS	60
ÍNDICE DE CUADROS	61
REFERENCIAS	62

RESUMEN

MONROY DÍAZ LILIA DANIELA. (bajo la dirección de: la Dra. MVZ. Laura Cobos Marín y de QBP. Erik Eduardo Nieto Patlán, M.C, MVZ. Ana Delia Rodríguez Cortez).

El lentivirus caprino o lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) ocasiona afecciones importantes a la salud caprina y pérdidas significativas al sector de la caprinocultura nacional. En México, las pruebas serológicas disponibles para su diagnóstico provienen de otros países, por lo que el contar con inmunoreactivos para la implementación de pruebas diagnósticas permitiría la innovación en el país. En este trabajo se optimizó la metodología para obtener la proteína recombinante p16 a partir de un trabajo previo, se secuenció la región codificante y se elaboró un suero hiperinmune en conejos. Para ello se realizó la transformación de la cepa *Escherichia coli* recombinante (*rosetta*) con el plásmido PET24 que codifica para p16, se realizó una PCR y la secuenciación el producto para verificar la clonación. Se sembró una colonia de *Escherichia coli rosetta* y se sobre expresó la producción de la proteína p16. Se corroboró su presencia con Western Blot (WB) contra la cola de histidinas de la construcción del plásmido y posteriormente se constató su reconocimiento por sueros de animales seropositivos y seronegativos a la enfermedad, mediante WB. Se purificó la proteína de matriz p16 por las técnicas de kit comercial de purificación de proteínas y la técnica de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad, se cuantificó y se realizó un protocolo de inmunización en un modelo de conejo utilizando la proteína purificada y tres tipos de adjuvantes: adjuvante de Freund completo e incompleto y porinas Omp C y Omp F.

ABSTRACT

MONROY DIAZ LILIA DANIELA. (under the direction of: Dr. MVZ. Laura Cobos Marín and QBP. Erik Eduardo Nieto Patlán, MC, MVZ. Ana Delia Rodríguez Cortez).

Caprine lentivirus or small ruminant lentivirus (LVPR) causes important effects on goat health and economic to the national goat farming sector. In Mexico, the serological tests available for diagnosis come from other countries, so having immunoreactives for the implementation of diagnostic tests would allow innovation in the country. In this work, the methodology for obtaining the p16 recombinant protein was optimized from a previous work, the coding region was sequenced and a hyperimmune serum was prepared in rabbits. For this, the transformation of the recombinant *Escherichia coli* strain (*rosetta*) was carried out with the PET24 plasmid that codes for p16, a PCR was carried out and the sequencing of the product was carried out to verify cloning. A colony of *Escherichia coli rosetta* was seeded and the production of the p16 protein was overexpressed. Its presence was corroborated with Western Blot (WB) against the histidine tail of the plasmid construction and later the recognition by sera of seropositive and seronegative animals to the disease was confirmed by WB. The p16 matrix protein was purified by the techniques of the commercial protein purification kit and the high speed protein liquid chromatography technique, it was quantified and an immunization protocol was carried out in a rabbit model using the purified protein and three types of adjuvants: complete and incomplete Freund's adjuvant and Omp C and Omp F porins.

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AGID	Inmunodifusión en gel de agar
B1	Subtipo genético de la enfermedad
CA	Cápside
Cbp	Cuanto baste para
dH2O	Agua destilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
Du p17	Proteína viral dUTPasa
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EIAV	Virus de la anemia infecciosa equina
Env	Gen de la envoltura
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FIV	Virus de la inmunodeficiencia felina
G	Fuerza G (unidad de medida de gravedad)
Gag	Gen del grupo antígeno
Gp135	Glicoproteína de superficie
Gp38	Glicoproteína transmembranal
HCL	Ácido clorhídrico
HRP	Peroxidasa del rábano (Horseradish Peroxidase-labeled
Antibodies	
H2O	Agua
IBT	Instituto de Biotecnología
IFIA	Inmunocromatografía de flujo lateral
IN, p29	Proteína viral integrasa
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Kb	Kilo base
kDa	KiloDalton
L	Litro (unidad de medida)
LB	Medio de cultivo o caldo luria (Luria Bertani LB)
LvPR	Lentivirus de pequeños rumiantes
LvC	Lentivirus caprino
LTR	Región no codificantes de replicación larga
MA	Matriz
mA	Miliamperio
Mg	Miligramo
Min	Minuto (unidad de tiempo)
mM	Milimolar
µL	Microlitro
ml	Mililitro (unidad de medida)
M/mol	Molar
NaCl	Cloruro de sodio
NC	Nucleocápside
NI	No inducido
Nm	Nanómetro
OD600	Longitud de onda de 600 nanómetros
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PB	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBS tween20	Tampón fosfato salino con detergente no iónico Tween TM 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR MM 2x	Kit PCR Master Mix 2x
PFW	Primer forward
PRV	Primer reverse
Pol	Gen polimerasa
PVDF	Membrana polidivilino de fluoruro
PR, p12	Proteína de proteasa

P16	Proteína de matriz
P14	Proteína de nucleocápside
P28	Proteína de cápside
Rev	Gen modulador del procesamiento del ARNm
RPM	Revoluciones por minuto
RT, p66/p51	Proteína de transcriptasa reversa
RT/RNasa	Transcriptasa reversa
SH	Suero hiperinmune
SU	Glicoproteína de superficie
Tat	Gen de transcripción viral
TM	Transmembranales
Tm	Temperatura de fusión (melting temperature)
UV	Ultravioleta
vAEC	Virus de la artritis encefalitis caprina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia del simio
VIB	Virus de la inmunodeficiencia bovina
vMV	Virus de Maedi-visna
Vif	Gen de la infectividad viral
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados

INTRODUCCIÓN

La caprinocultura en México es una actividad que se ha impulsado en su desarrollo productivo. Actualmente, cuenta con un inventario ganadero de 8,830,720 de cabezas (SIAP, 2021). La crianza del ganado caprino encuentra su rentabilidad en la obtención de carne que se destina para venta y consumo, con una producción nacional de 40 mil toneladas en canal. Mientras que la leche de cabra con 167 millones de litros en 2022 y que fue destinada para consumo humano, la elaboración de quesos y dulces gourmet. (SIAP, 2022).

En países en desarrollo, la caprinocultura representa el principal ingreso económico del área pecuaria para los pequeños productores, siendo uno de los medios de ingreso y alimento familiar (Escareño et al., 2013); (Salinas-Gozáles et al., 2013).

A pesar de que se estima que más del 68.5% de la producción Nacional proviene del sistema extensivo, que generalmente es de autoconsumo (INEGI, 2007); en México existen sistemas intensivos de producción caprina con buenos parámetros económicos, reproductivos y productivos (Paramio & Izquierdo 2014). Su objetivo, al igual que en los sistemas mixtos, es generar productos para la venta y para ello se llevan registros sobre la producción, medicina preventiva y presencia de enfermedades.

Las principales zonas en que se desarrolla la producción con caprinos en nuestro país son las siguientes: (Cuadro 1).

Cuadro 1. Zonas donde se desarrolla la producción con caprinos en nuestro país		
Zona	Estados	% Población caprina
Occidental	Sinaloa y Baja California Sur	El 8% de la población caprina nacional
Norte	Estepas desérticas de Nuevo León, Coahuila, Chihuahua, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí	Cerca del 50% de la población caprina nacional
Centro	Bajío mexicano	10% de la población caprina del país

Sur	Regiones montañosas y sabanas arbustivas de Oaxaca, Puebla, Guerrero e Hidalgo	El 28% de la población caprina nacional
-----	--	---

Tomado y adaptado de Vázquez y Ducoing-Watty 2011.

Lentivirus de pequeños rumiantes en cabras

La enfermedad lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR), antes conocida como artritis encefalitis caprina (vAEC), es de gran importancia en la producción caprina debido a las repercusiones económicas y a los problemas de salud que afecta tanto a cabritos como a cabras adultas.

Las infecciones por lentivirus en ovinos y caprinos anteriormente se consideraban específicas de especie, el virus de Maedi-Visna (vMV) en ovinos (Sidgursson et al., 1957) y vAEC en caprinos. (Pétursson et al., 1992) Sin embargo, a partir del 2004, estos dos virus fueron reclasificados como LvPR, con base en estudios de epidemiología molecular cuyos análisis filogenéticos relacionan estrechamente al vAEC con el virus de vMV, demostrando que ambos virus comparten características genéticas similares. (Shah et al., 2004; Leroux et al. 2010; Blacklaws 2012). La enfermedad causada por LvPR en cabras (lentivirus caprino) está considerada en el grupo 3 de la lista de las enfermedades y plagas endémicas que representan un riesgo menor desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y para el comercio nacional e internacional y es de notificación obligatoria y reporte mensual. (SENASICA, 2020).

El lentivirus caprino (LvC) fue descrito por primera vez en Estados Unidos en 1974 por Cork *et al.* y se aisló en 1980, a partir de la membrana sinovial de cabras afectadas con artritis. (Trigo Tavera, 1991). Se introdujo a México en 1983 y desde entonces ha habido importantes repercusiones económicas ya que el virus permanece latente en el animal infectado, provocando una disminución en su vida productiva (Ducoing, 2007). En el año 2010 se realizó un estudio serológico en caprinos provenientes de la región central de México, y con la secuenciación del genoma completo denominado como FESC-752 (No. de acceso HM210570.1) se determinó la presencia del subtipo genético B1 del LvPR (Vazquez Franco

N.C. & Ducoing Watty, A.E., 2011, Ramírez *et al.*, 2011). Sin embargo, la enfermedad suele estar subdiagnosticada en el país.

Presenta una distribución mundial que afecta principalmente a productoras de leche en países industrializados como Canadá, España, Francia, Italia, EUA con prevalencias del 65% al 80% (East *et al.*, 1987), (Stonos *et al.*, 2013). En nuestro país existe evidencia de la presencia de la enfermedad en diferentes estados, con porcentajes de prevalencia variados, según el tipo de unidad de producción; siendo del 4% al 55% en sistemas intensivos (Nazara *et al.* 1985). En sistemas extensivos y semi-intensivos en los que se intercambian animales entre productores e incluso, entre otros estados de la República Mexicana no se realiza el monitoreo para la identificación de los LvPR (Smith and Sherman, 2009). Actualmente se ha visto que la enfermedad se ha propagado dentro de todo el territorio nacional (de la Luz J., Ducoing A, et al. 2021). En un estudio realizado en 2021 en 6 estados, se encontró un 53.9% de seropositividad, en 376 sueros de animales con signología sugerente a la enfermedad y diagnosticada por ELISA (de la Luz, et al. 2021). En el siguiente mapa se muestran los estados con mayor tasa de seropositivos que fueron identificados en el estudio previamente mencionado (Figura 1).



Figura 1. Frecuencias serológicas de LvPR en cabras, reportadas en diferentes estados de la república. En 2019, se reportó el 33.6% de seroprevalencia general, posicionando a los Estados de

Querétaro, Veracruz y Guanajuato con los índices más altos. (Mendiola et al., 2019). En el estudio de la Luz, et al., la distribución de cabras seropositivas en los años analizados (2009-2018) fue de 11.6%, identificando los estados de Sinaloa, Querétaro y Ciudad de México con mayor tasa de seropositivos. (de la Luz, et al. 2021)

Estructura y genoma

Los LvPR pertenecen a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus*. Su genoma está compuesto por dos copias idénticas de ARN lineal de sentido positivo de 8.4 - 9.2 kb de longitud. La partícula viral mide entre 80 a 100 nm de diámetro, es sensible al calor, detergentes y el formaldehído. Los LvPR se conforman de aproximadamente un 60% de proteínas, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 1% de ARN (Sidgursson *et al.* 1957, Pétursson *et al.*, 1992, ICTV 2009).

Su estructura consta de una doble membrana externa de envoltura, en la que se localizan las proteínas de superficie (SU) y transmembranales (TM) que utiliza para entrar en la célula blanco. Después presenta una matriz proteica (MA) y dentro de ella se encuentra otra estructura en forma de cono: la cápside (CA), que contiene el genoma viral y las enzimas transcriptasa reversa (RT) e integrasa (IN). Cada virión contiene dos copias de genoma viral unidas de forma no covalente, como dímero; su composición es 38.2% adenina, 16% citosina, 25.1% guanina y 20.8% uracilo; a esta cadena de ácidos nucleicos se asocia una proteína llamada nucleocápside (NC). (figura 2. A). En el genoma viral se encuentran 3 genes poliproteínicos que codifican proteínas estructurales y enzimas virales: el gen *gag*, *pol* y *env* y 3 genes reguladores: *vif*, *tat* y *rev* esenciales en la replicación del virus. (Gilles & Robert, 1999; Cunha, et al. 2001) (figura 2. B).

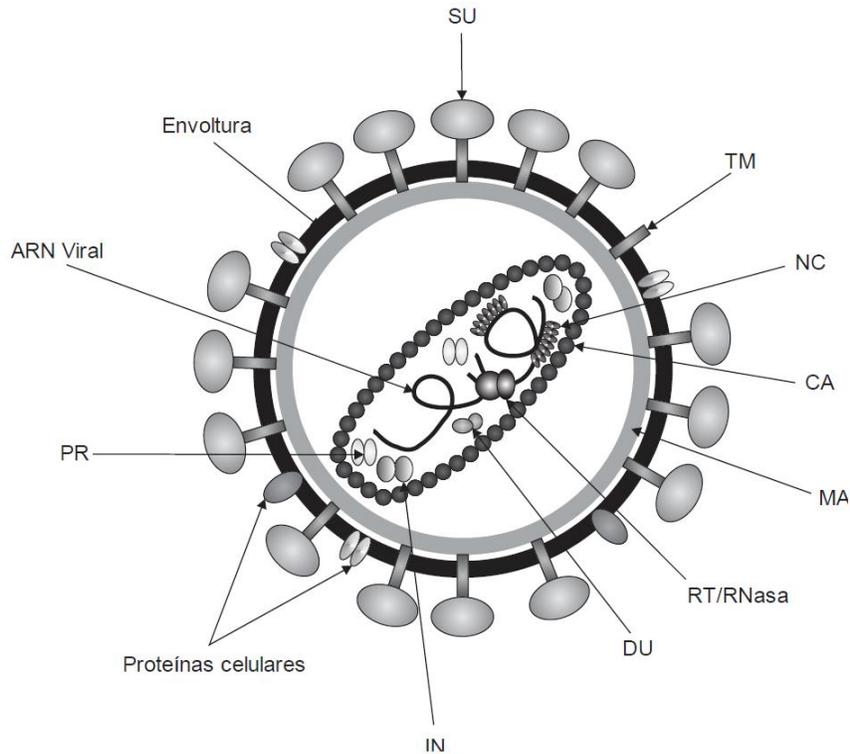
Las características generales de estos genes poliproteínicos, así como las proteínas que codifica cada uno, se enlistan en el siguiente cuadro: (Cuadro 2).

Cuadro 2. Principales funciones del genoma viral y proteínas codificadas		
Gen	Proteína codificada	Función
<i>Gag</i>	Codifica para proteínas estructurales de matriz	Se encarga de dirigir el ensamblado de las partículas virales.

	(p16), cápside (p28) y nucleocápside (p14)	
<i>Pol</i>	Codifica para enzimas virales de la proteasa (p12), retrotranscriptasa (p66/p51), la dUTPasa (p17) y la integrasa (p29)	Su función yace en el ciclo de replicación viral que es crucial para la transcripción inversa e integración genómica
<i>Env</i>	Codifica para proteínas de la envoltura (glicoproteínas de superficie) proteína de superficie (gp135) y transmembranal (gp38)	Se encargan de determinar el tropismo viral y permiten el ingreso del virus a la célula por medio de fusión a la membrana celular
<i>Tat, vif y rev</i>	Codifica proteínas esenciales para la replicación viral que son tat, vif y rev	Se encarga de activar la transcripción viral, de la infectividad viral del virión y de la traducción del ARN

Tomado de Gilles & Robert 1999; Cunha et al. 2001. Adaptado de Vázquez 2011.

A.



B.

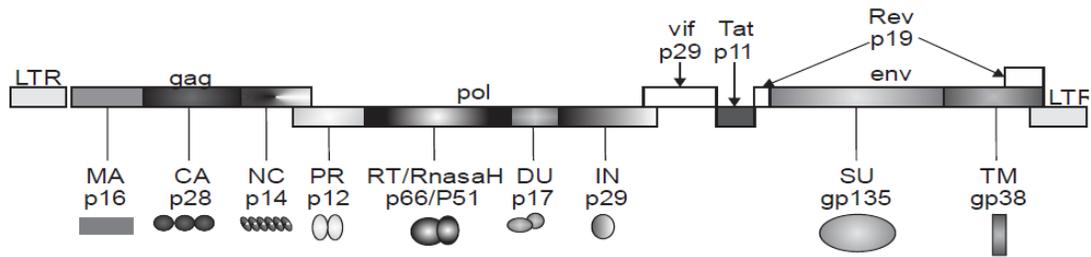


Figura 2. A) estructura del LvPR. SU: proteínas de superficie, TM: proteínas transmembrales, NC: nucleocápside, CA: cápside, MA: matriz, RT/RNasa: transcriptasa inversa, DU: dUTPasa, IN: integrasa, Proteínas celulares, PR: proteasa, ARN viral, Envoltura. B) Organización genética. Tomado de Enciclopedia de virología segunda edición y modificado (Gilles & Robert 1999).

Actualmente se clasifican en 4 grupos genéticos denominados del A-D, con una diferencia de un 25–37% en sus secuencias de nucleótidos de dos fragmentos del genoma. Uno procedente del gen *gag* y el segundo perteneciente al gen *pol*. En el grupo genético A se han reconocido 22 subtipos genéticos diferentes (A1-A22), mientras que para el grupo B, solamente 5 subtipos genéticos (B1-B5); en el grupo C se encuentran clasificados los

aislamientos de Noruega, y en el D las secuencias de Suiza y España (Glaria et al., 2015, Workman *et al*, 2017).

Ciclo de replicación

El ciclo de replicación inicia cuando la glicoproteína de superficie SU, gp135 del VAEC reconoce al receptor celular presente en las células blanco, que son los monocitos/macrófago y células dendríticas. Posteriormente, por medio de la proteína transmembranal se hace la fusión de la membrana viral con la membrana celular. La nucleocápside es liberada dentro del citoplasma donde la transcriptasa reversa sintetiza una copia complementaria de ADN (provirus), la cual es transportada al núcleo para su integración en el ADN cromosómico de la célula (Figura 3).

Una de las características de los lentivirus en su ciclo de replicación es la integración de una copia de ADN intermediario en el genoma de la célula hospedadora denominado como provirus. El provirus se encuentra flanqueado en sus extremos por una región no codificante de repetición larga (LTR, Long Terminal Repeat). La secuencia LTR, regula la transcripción, el periodo de latencia y la expresión viral. Se transcribe en el núcleo celular donde se sintetiza el genoma. (Pétursson et al, 1992).

El provirus permanece en forma latente en los monocitos hasta su maduración en macrófagos, en este momento se activan factores transcripcionales que inician la expresión de ARN mensajero (ARNm) para la expresión de proteínas y síntesis de nuevas partículas virales.

Las proteínas codificadas por los genes estructurales *gag* y *pol* son sintetizadas en los ribosomas del citoplasma celular, mientras que las proteínas codificadas por el gen *env* se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso, para después ser modificadas en el aparato de Golgi y ensambladas junto con el ARN genómico y formar la estructura viral. Estas estructuras son liberadas por gemación a través de la membrana plasmática, sin producir lisis celular, de este modo el virus asegura la continuidad de la infección (Coffin, 1996, Cunha et al., 2001).

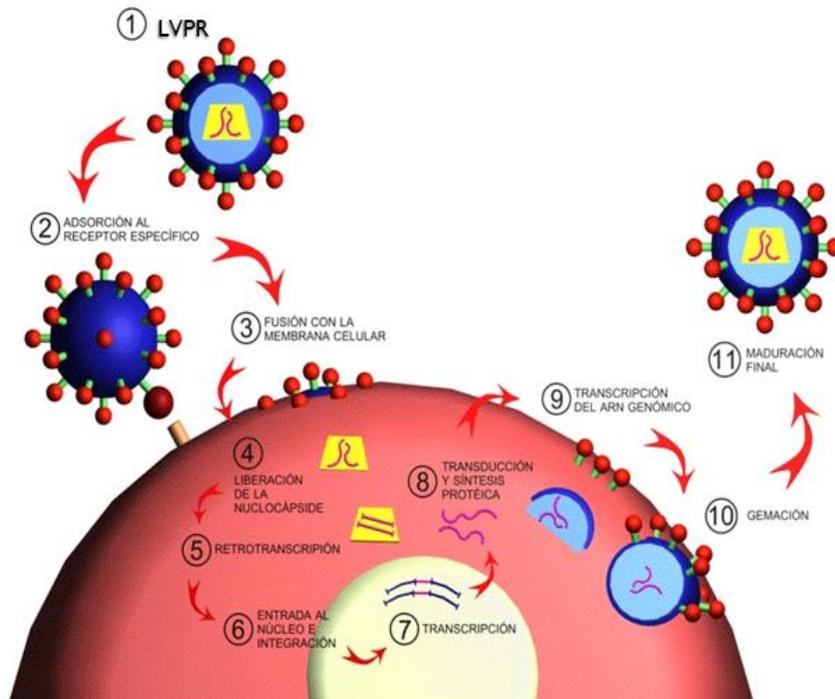


Figura 3. Ciclo de replicación viral de LvPR. (Adaptado de Perdignes, 2004).

Transmisión

La transmisión se da durante los primeros meses de vida del cabrito, principalmente por la ingesta de calostro procedente de hembras previamente infectadas con LvPR. Otra forma en la que los ovinos y caprinos puedan infectarse es por aerosoles a través del contacto directo prolongado y por agua o alimento contaminado. Además, se ha detectado la presencia de ADN proviral en el tracto reproductor de las hembras por lo que es posible la transmisión de forma intra-uterina, así como en el tracto genital de machos y líquido seminal (Mohamad et al., 2012, Andréia et al, 2013) (Figura 4).

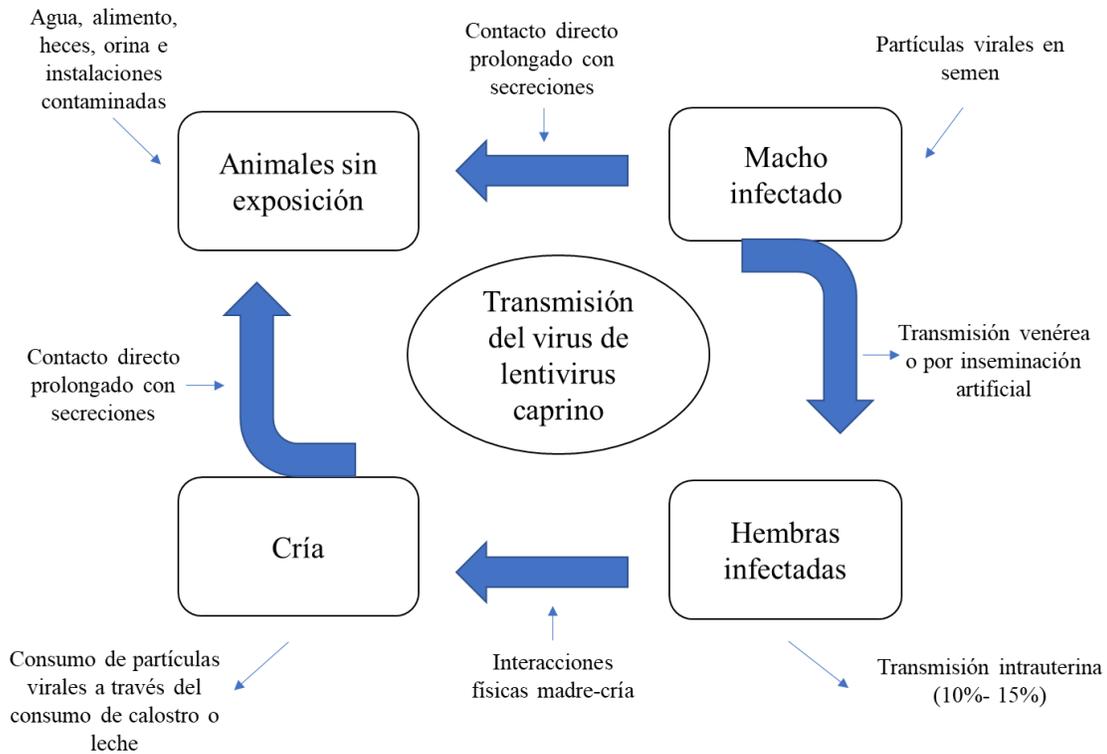


Figura 4. Representación esquemática de la transmisión del VAEC. (Tomado y adaptado de Mohamad et al., 2012, Andréia et al, 2013).

Patogenia y lesiones

Una vez que el virus se encuentra dentro del animal, su tropismo es por los monocitos, macrófagos y células dendríticas. Cuando los monocitos maduran a macrófagos, la replicación del virus aumenta, y puede ser trasladado a distintos órganos del hospedero, evadiendo la respuesta inmune. Los anticuerpos contra la infección por LvPR se producen en las fases tempranas de la enfermedad; sin embargo, la respuesta inmune en el hospedero es incapaz de mantener títulos altos de anticuerpos neutralizantes cuando la infección se encuentra en un estado latente (provirus). Posteriormente, el virus migra a ganglios linfáticos, en donde es captado por células presentadoras de antígeno, lo que conlleva a procesos inflamatorios crónicos en los órganos blanco y con ello la aparición de los cuadros clínicos. (Peluso et al., 1985, Blacklaws et al., 2012).

El LvPR afecta a cabras jóvenes y adultas; su periodo de incubación es variable, por lo que la enfermedad puede desarrollarse después de meses a años. En cabritos de 2 a 4 meses de

edad se puede observar ataxia y paresia posterior, que puede evolucionar a una paresia generalizada en pocas semanas. En animales adultos la principal lesión es la poliartritis proliferativa crónica. Las articulaciones carpianas son las más afectadas lo que provoca la disminución progresiva de la movilidad, con la consiguiente dificultad para conseguir alimento, provocando una baja ganancia de peso y pelaje hirsuto (Nazara, 1985); (Trigo Tavera, 1991). En hembras se presenta mastitis intersticial que puede evolucionar a la induración de la glándula produciendo cantidades inferiores de leche con apariencia normal. (Martínez-Navalón *et al.*, 2001; The center for Food Security & Public Health, 2007).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo se puede realizar mediante la evaluación clínica y la observación e identificación de las lesiones características de la enfermedad. Sin embargo, los signos clínicos pueden confundirse con otras enfermedades, como la poliencfalomalacia, scrapie, la deficiencia en cobre o clamidiasis (Trigo Tavera, 1991) por lo que es importante realizar pruebas confirmatorias de laboratorio para obtener el diagnóstico definitivo. Estas pueden dividirse en técnicas directas e indirectas dependiendo de la muestra y el estudio que se decida realizar (Cuadro 3).

Cuadro 3. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de LvC y su propósito.					
Propósito					
Método	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección-vigilancia
Técnicas directas					
Aislamiento viral	-	-	-	+	-

PCR/RT-PCR	+	+	++	++	++
Técnicas indirectas					
AGID	+	+++	++	+++	+++
ELISA	+++	+++	+++	+	+++
WB	+++	+++	+++	+	+++

Claves: +++= método recomendado y validado para este propósito; ++= método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; += puede utilizarse en algunas situaciones, pero el costo, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; -: no adecuado para este propósito. PCR= reacción en cadena de la polimerasa, RT-PCR= reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción, AGID= inmunodifusión en gel de agar, ELISA= ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, WB= western blot. Tomado y adaptado de Manual Terrestre OIE, 2018.

La técnica directa y confirmatoria es el aislamiento viral, pero es complicada y costosa, debido a que hay bajos niveles de virus en sangre y los cultivos muchas veces no muestran cambios que indiquen la presencia del virus. Por ello, algunos autores han propuesto que las pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la cadena de la polimerasa con reverso transcripción (RT-PCR) se pueden utilizar para identificar al agente (Barquero, 2013). Sin embargo, en México no se realizan de forma rutinaria por su elevado costo. Recientemente se han implementado pruebas para el diagnóstico de lentivirus caprino con la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Balbin, Lertanantawong, Suraruengchai, & Mingala, 2017; Tu, Shiau, Lai, Yang, & Wang, 2017) Esta técnica se considera una herramienta molecular simple en la detección de diferentes enfermedades con el fin de tener un método alternativo de la PCR, que fuera específico y sensible. Sin embargo, hay algunos factores que reducen su aceptabilidad en el entorno clínico y de laboratorio (Balbin, Lertanantawong, Suraruengchai, & Mingala, 2017).

Las técnicas indirectas o pruebas serológicas son los métodos más difundidos y convenientes para identificar una infección por lentivirus de pequeños rumiantes debido a su facilidad de obtención y costos. La OIE propone como pruebas el inmunoensayo enzimático (ELISA) y la inmunodifusión doble en gel de agar (AGID). También se llevan a cabo otras técnicas como la inmunoelectrotransferencia de tipo Western y de radioinmunoprecipitación, ambas

son los estándares de comparación para establecer la sensibilidad y especificidad de las pruebas AGID y ELISA, pero solo se realizan en laboratorios especializados. La sensibilidad y especificidad de la AGID y del ELISA dependen de la cepa de virus usada, de la preparación del antígeno vírico y de la prueba estándar de comparación. (Manual terrestre de la OIE, 2018) (Cuadro 4).

El tiempo requerido para la seroconversión después de la infección puede ser relativamente prolongado e impredecible. Se ha reportado que las cabras infectadas producen anticuerpos tipo IgG contra las principales proteínas del virión entre las dos semanas y hasta los 48 meses posteriores a la infección (De Andres et al., 2005; Leginagoikoa, 2010). En un inicio se observa un incremento progresivo de anticuerpos hasta alcanzar un pico máximo que desciende gradualmente a sus niveles basales, pero en algunos estudios se ha reportado intermitencia en los niveles séricos de anticuerpos, lo cual podría afectar a la prueba al arrojar falsos negativos (Tu et al., 2017). Sin embargo, después de la seroconversión, la respuesta de anticuerpos generalmente persiste y las cabras que son positivas para anticuerpos se consideran portadoras de virus (Manual terrestre de la OIE, 2018).

Cuadro 4. Pruebas diagnósticas de LvC, ventajas y desventajas				
Tipo de prueba	Nombre	Detecta	Ventajas	Desventajas
	AGID	Ac's	Bajo costo, específica, reproducible y fácil de realizar	Proceso lento y experiencia para interpretar resultados
	ELISA	Ac's	Rápido, relativamente económico, cuantitativo y	Repetibilidad y variabilidad antigénica

Serológicas	Western Blot	Ac´s	de fácil reproducibilidad Prueba de oro para LVPR	Se requiere equipo especializado y es más tardado
	Radioinmunoprecipitación	Ac´s	Elevada sensibilidad y especificada	Complejidad de la técnica, condiciones obligatorias de seguridad biológica y manejo de sustancias radioactivas
Moleculares	PCR/RT-PCR	ADN, ARN, Provirus	Se podría identificar cepa circulante	Costoso, se requiere personal capacitado
	LAMP	ADN, ARN	Altamente específica	Costoso, personal capacitado y poca difusión

Tomado y adaptado de Ramos R. 2019

Proteínas inmunodominantes y la proteína de matriz p16

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra proteínas virales como la p16, p28, gp38 y gp135 (Peterhans et al. 1994). Predominan el reconocimiento de las proteínas del gen *gag* debido a que estimulan una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección (Martínez Rodríguez et al. 2005; Bertolotti et al., 2011). Las proteínas que han sido reportadas como

immunodominantes son la p28 y p16 del gen *gag* y del gen *env* la gp135. (Perry et al. 1995; Johnson et al. 1983; Rimstad & East, 1994).

La proteína 16 tiene la función de dirigir la poliproteína gag a la membrana plasmática y unir a la cápside y la envoltura externa. Esta proteína fue utilizada para elaborar una ELISA indirecta que mostró concordancia con la ELISA comercial (Siliceo, 2014). Además, tiene una relevancia debido a que puede ser detectada al inicio de la infección y es un buen marcador de infección en animales que son negativos a la proteína de cápside. (Grego et al. 2005)

Inmunoreactivos

Proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

Las proteínas recombinantes (PR) han sido ampliamente utilizadas con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunales. Estas son biomoléculas que generalmente se expresan en microorganismos fácilmente manipulables y heterólogos, con el fin de producirlas en grandes cantidades. La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) ha sido utilizada en la industria biotecnológica para la producción PR a partir de un gen clonado en un plásmido o vector de expresión y ha sido bien caracterizada desde el punto de vista genético y fisiológico. (Ferrer N et al. 2009). Este sistema se ha utilizado durante décadas y constantemente se le realizan modificaciones genéticas para ampliar su uso y maximizar la expresión de la proteína de interés (Jia, B 2016) (Figura 5).

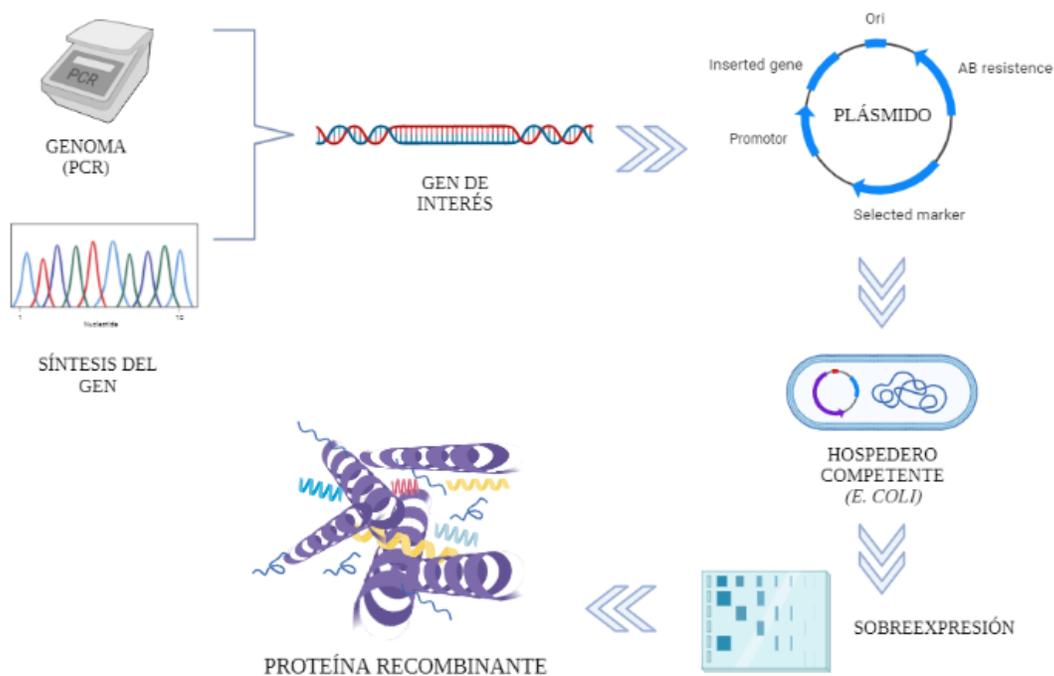


Figura 5. Esquema general para la obtención de un DNA recombinante para la sobreexpresión de una proteína. (Adaptado de Hernández, et al 2021 y creada con la herramienta BioRender.com)

Uno de los objetivos para la sobreexpresión de una PR, es que puedan producirse una gran cantidad de proteínas solubles a partir de vectores de fácil cultivo, a fin de tener altos rendimientos de la PR de interés. Algunos de los parámetros que tienen un fuerte efecto tanto en la productividad por célula como en la densidad celular son los medios de cultivos (nutrientes), la oxigenación, las condiciones de inducción, el tipo de promotor del plásmido de clonación, la optimización del uso de codones, la elección del hospedero, entre otros. (Liu M, et al 2015). Además, para alcanzar altos rendimientos se debe seleccionar un sistema de expresión adecuada, este sistema la conforma la cepa huésped y el vector de expresión. De tal forma que ambos componentes deben ser compatibles con la maquinaria celular requerida para llevar a cabo dicho proceso. (Hernández, et al 2021)

En particular, la cepa *E. coli* BL21 es preferida en el ámbito industrial. Además de carecer de las proteasas Lon y Omp-t (lo cual reduce considerablemente la degradación de la PR dentro de la bacteria), produce bajas cantidades de acetato (un subproducto metabólico altamente indeseable debido a que a altas concentraciones llega a ser tóxico para las células

ya que permea fácilmente las membranas desacoplando el gradiente de pH transmembranal provocando inhibición en el crecimiento celular), lo que resulta muy atractivo (Phue y *col.*, 2005). Hay diversas cepas derivadas de BL21, la cepa denominada *rosetta* es diseñada para incrementar la expresión recombinante de genes eucarióticos que contienen codones raros para *E. coli* y también se emplea para la expresión recombinante de genes de especies procariontas alejadas filogenéticamente de *E.coli*, que también presenten codones raros (Jia B, Jeon CO 2016).

Antisueros

Los antisueros son una herramienta biológica que se utilizan en el diagnóstico serológico con el fin de detectar la enfermedad. Se pueden emplear en técnicas como el ELISA o en pruebas rápidas de campo. También se utilizan como inmunidad pasiva por sus altas concentraciones de anticuerpos.

Los antisueros convencionalmente se obtienen mediante un proceso de hiperinmunización con un antígeno particular, de ahí que también se les conoce como sueros hiperinmunes (SH). Aunque la mayoría de los antisueros de utilidad diagnóstica se pueden obtener comercialmente, en ocasiones pueden ser fácilmente preparados a un costo menor. Para la elaboración de un SH se han empleado distintas especies animales como conejos, ratones, ratas, cabras, o caballos. Por su facilidad de manejo y el volumen de sangre que puede obtenerse del conejo, es una especie ampliamente utilizada en la elaboración de SH.

Para establecer un esquema de inmunización se deben considerar diferentes factores, entre ellos la naturaleza del antígeno, las dosis, adyuvante; así como, que el hecho de que la inmunogenicidad de este depende del sistema inmune al que se enfrente. Cuando se comparan distintos esquemas de inmunización en individuos genéticamente heterogéneos es imposible determinar si las diferencias observadas en la respuesta son atribuibles al esquema utilizado o a las características genéticas de cada individuo. El alto costo y esfuerzo que presupone esto, limita sensiblemente la posibilidad de realizar estudios comparativos para optimizar esquemas de inmunización (Lomonte V, 2007).

A partir de la inmunización de un animal podemos obtener anticuerpos policlonales o las clonas de linfocitos B para generar hibridomas y producir anticuerpos monoclonales. Su diferencia radica en que los anticuerpos monoclonales provienen de una sola clona de linfocito B y, por lo tanto, tienen la capacidad de reconocer un epítipo específico de un antígeno. Por otro lado, los anticuerpos policlonales son capaces de reconocer múltiples epítopos de un antígeno, lo que hace que sean menos específicos, pero más accesibles y fáciles de obtener (Tian et al, 2018).

Hay diversas sustancias que poseen actividad adyuvante, el más utilizado en la elaboración de SH es el adyuvante de Freund, que puede obtenerse de dos formas: adyuvante completo de Freund (ACF) que consiste en una solución acuosa con el Ag (una suspensión de *Mycobacterium* muerto por calor), junto con aceite mineral y un agente dispersante (el manoleato) y el adyuvante de Freund incompleto (AIF) que contiene lo mismo ya descrito a excepción de la suspensión de *Mycobacterium* (Guerrero & Gatta, 1982, Herbert, 1978). Aunque el uso de estos adyuvantes da buenos resultados, provoca reacciones locales inflamatorias, abscesos y granulomas que ocasionan daño y sufrimiento al animal (Bernagozzi J, Barragán J. 2014), por lo que su uso es cuestionable desde el punto de vista ético.

Porinas Omp C y Omp F como adyuvantes

Una alternativa para la producción de SH es el uso de las porinas como adyuvantes. Estas son un grupo de proteínas (OMP por sus siglas en inglés) que se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram negativas que controlan principalmente la entrada de compuestos y la salida de productos de desechos, forman canales acuosos y permiten la entrada pasiva de moléculas hidrofílicas por medio de poros o filtros (Nikaido, 2003; Guillier, et al., 2006). Las porinas purificadas de *Salmonella entérica* serovar *Typhi* constan de una mezcla de dos proteínas, Omp C y Omp F que se arreglan como homotrímeros (Thulasingham et al. 2017). Se ha descrito que las porinas se unen a TLRs y estimulan a las células presentadoras de antígeno, favoreciendo la activación de las células T cooperadoras y promoviendo la respuesta por anticuerpos (Cervantes-Barragán et al. 2009; Carreño et al. 2017). Debido a estas propiedades las porinas de diversas bacterias se han utilizado de forma experimental como adyuvantes a la vacunación (Wetzler 2010; Toussi, Liu, and Massari 2012).

ANTECEDENTES

El uso de la proteína de matriz P16 en técnicas diagnósticas serológicas para la detección de la enfermedad ha demostrado que es inmunogénica y un buen marcador de infección en animales positivos a la enfermedad. Además, se ha detectado la presencia de anticuerpos contra la proteína viral p16 al inicio de la infección, lo que sugiere que puede ser un buen marcador de infección en animales que son negativos a otras proteínas virales (Grego et al. 2005). En nuestro grupo de trabajo se diseñaron oligonucleótidos que codifican para la p16 y se clonaron sus productos de PCR en un plásmido PET24 para transformar cepas de *E. coli* y sobre expresar proteínas recombinantes (Vazquez F, 2011). La proteína p16 recombinante se utilizó en una ELISA indirecta y con una técnica multiplex de luminex para detectar la enfermedad dando resultados favorables (Siliceo C. 2014, Nájera. 2017). Recientemente, se empleó en un ensayo multiplex de Luminex para el diagnóstico serológico de LVPR, brucelosis y paratuberculosis en cabras (Nájera H. D, et al., 2023).

JUSTIFICACIÓN

El LvPR en cabras ocasiona afecciones importantes a la salud caprina y pérdidas significativas al sector de la caprinocultura nacional. En México es un reto realizar pruebas serológicas para su diagnóstico debido a los elevados costos de los kits de ELISA comerciales. El contar con inmunoreactivos en cantidad suficiente es esencial en el desarrollo de nuevas pruebas serológicas o en la optimización las pruebas diagnósticas actuales, lo que podrá generar un impacto positivo en la innovación y la disminución de la dependencia tecnológica en el país.

HIPÓTESIS

Es posible optimizar la producción de inmunorreactivos para el diagnóstico de LVPR mediante el uso de las *Escherichia coli rosetta* para la obtención de la proteína p16 recombinante y las porinas Omp C y Omp F de *Salmonella entérica* serovar *Typhi* como adyuvante en la elaboración del suero hiperinmune anti p16.

OBJETIVO GENERAL

Optimizar el método de obtención de la proteína recombinante p16 de LvPR y su antisuero para su uso como inmunoreactivos en pruebas serológicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Optimizar el método de obtención de la proteína recombinante p16 de LvPR, mediante el uso de *Escherichia coli* rosetta transformadas con el plásmido PET24 que expresa la secuencia que codifica para la proteína.
2. Demostrar la correcta inserción del gen que codifica para la proteína recombinante P16, mediante la amplificación por PCR de la región codificante, su secuenciación y comparación con el genoma de VAEC reportado en el GenBank.
3. Demostrar la inmunogenicidad de la p16 recombinante mediante la prueba de Western Blot, utilizando sueros de cabras positivas a la enfermedad.
4. Evaluar dos métodos de purificación de la proteína p16 recombinante, para determinar cuál es óptimo.
5. Evaluar a las porinas Omp C y Omp F purificadas de *Salmonella entérica* serovar *Typhi* como adyuvantes, para obtener un suero hiperinmune anti P16 en conejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE BACTERIAS *ESCHERICHIA COLI ROSETTA* TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO PET24 QUE EXPRESA LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA P16 DE LVPR

Extracción del plásmido PET24 por lisis alcalina a partir de *Escherichia coli* BL21

El trabajo se realizó a partir de las bacterias *Escherichia coli* BL21 previamente transformadas con el plásmido PET24 que expresa la secuencia que codifica para la proteína p16 de LvPR. Las bacterias fueron donadas por el Dr. De la Peñas (Vázquez Franco, Ducoing

Watty 2011). Para ello se utilizó un método casero de lisis alcalina. Se obtuvieron 4 ml de cultivo en tubos de 15 ml, se centrifugó a 4,000 rpm por 10 minutos y se obtuvo el sedimento. Este se resuspendió en 200 µl de solución buffer I* y se decantó a un microtubo. Se adicionó 200 µl de solución buffer II*, se homogenizó y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 200 µl de solución buffer III*, se homogenizó hasta que se observó turbidez en la mezcla y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm a 4°C y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo. Posteriormente se agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA plasmídico y se mezcló bien por inversión suave y repetida. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante obteniendo el sedimento. (*Ver Anexo 1)

Finalmente se agregó 500 µl de etanol al 70% y se dejó reposar por 1 minuto. Se retiró el etanol y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente para que el etanol se eliminara por completo. Se agregó 100 µl de H₂O destilada, se homogenizó y se congeló a -20°C (Figura 6).

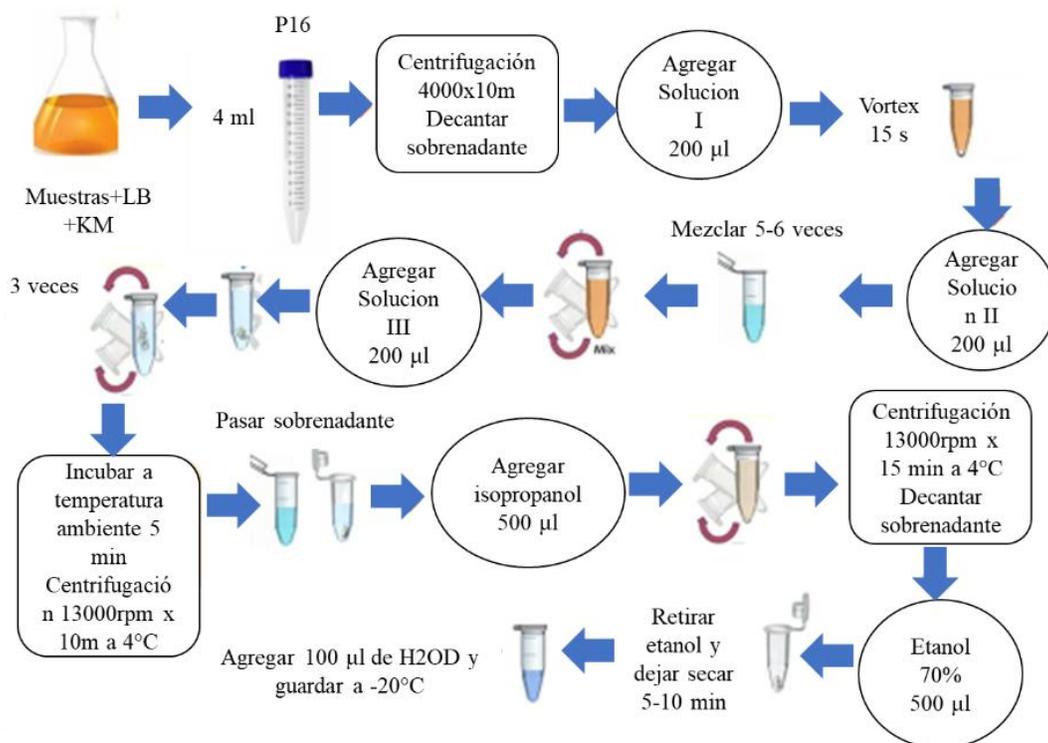


Figura 6. Esquema de extracción del plásmido por lisis alcalina. (Ilustración creada con la herramienta BioRender®)

Transformación de la *Escherichia coli* rosetta, con el plásmido PET24 por choque térmico

Se utilizó una alícuota del plásmido almacenada a -20°C , que se colocó en hielo para su descongelación. Se añadieron 50 μl del plásmido en las células competentes y se dejó reposar en el hielo por 20 minutos. Las células se incubaron en baño maría a 42°C por 30 segundos y se regresaron al hielo por 10 minutos, para permitir la entrada del plásmido por choque térmico. Posteriormente se incubaron 1 hora a 37°C en agitación (130 rpm). Finalmente se transfirieron 50 μl de la suspensión de células transformadas a placas de agar Lb con kanamicina a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con un asa “cell spreader” y se dejó incubar a 37°C por 24 horas. Todo el procedimiento se realizó en completa esterilidad con mechero y campana de flujo laminar.

Sobreexpresión de proteína p16

Al día siguiente se observó el crecimiento bacteriano y se seleccionaron 3 colonias aisladas y definidas. Las colonias seleccionadas se colocaron en medio líquido Lb y kanamicina, se dejaron crecer hasta su completa saturación a 37°C por 24 horas y se guardaron en congelación. Posteriormente cada colonia se sembró en un tubo de 15 ml con medio líquido Lb y kanamicina para incubarlas a 37°C en agitación (130 rpm) por 24 horas. Se realizó una dilución 1/50 en 4ml (80 μl suspensión bacteriana), se incubó a 30°C en agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.5. A partir de aquí, se separaron 2 ml de cultivo y los otros 2 se incubaron 6 horas con Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG a 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Terminada la incubación se recolectaron 500 μl en tubos de 1.5 ml, se centrifugó a 3000 rpm obteniendo el sobrenadante y el sedimento o pellet bacteriano. Este último se re suspendió con agua destilada.

Lisado de pellet bacteriano

Se reservó una alícuota del cultivo inducido por IPTG, se centrifugó a 7000 rpm por 15 minutos, se removió el sobrenadante y el pellet se almacenó a -80°C por dos horas. Posteriormente, el pellet se lisó con 2 ml de buffer de lisis/gr. Se agregó lisozima 1 mg/ml

para incubar en hielo por 30 minutos y luego 10mg/ml de DNasa I. Posteriormente se sonicó en hielo a 200 wats usando pistilos con 10 minutos de periodos de enfriamientos entre ellos y se agregaron 20 µl más de DNasa por 2 ml de buffer de lisis hasta que el lisado quedó viscoso debido a la liberación de ADN genómico en la solución. Se centrifugó a 10 000 gravedades por 30 min a 4°C y se guardó el sobrenadante en tubos de 2 ml. (Protocolo Profinity™ IMAC Resins, Biorad). Al final se corrió una SDS-PAGE al 12%* se corrieron en utilizando un amperaje constante de 20mA y voltaje variable a 60 min. Se usó un marcador de peso molecular de Prestainer ladder protein, Thermofisher®. Los geles se tiñeron con azul de coomassie y se dejaron en agitación por media hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados por 10 min con solución desteñidora (*Ver Anexo 3) (Figura 8).

Para determinar si la cepa *rosetta* producía una mayor cantidad de proteína recombinante que la cepa BL21 se realizó la cuantificación de las bandas observadas en geles SDS-PAGE correspondiente a las proteínas inducidas con IPTG usando el software semicuantitativo ImageJ (software de procesamiento y análisis de imágenes basado en Java).

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS

Extracción y amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína recombinante p16

Se extrajo el plásmido que expresa la secuencia que codifica para la proteína p16 de LvPR de las bacterias *E.coli rosetta* transformadas, nuevamente por el método casero de lisis alcalina y posteriormente se realizó una PCR utilizando la *PCR Master mix (2x) (*Ver anexo 2).

Los tubos se agitaron suavemente y se colocaron en un termociclador utilizando las condiciones recomendadas con una Tm de 56°C en alineamiento a 30 ciclos. Terminados los ciclos del termociclador, se preparó un gel de agarosa al 2.0% para visualizar el producto de PCR. Se dejó correr a 82 volts por 1 hora.

Terminada la hora, se colocó el gel en bromuro de etidio y se dejó 10 min incubando. Se procedió a revelar con luz UV para observar el resultado.

Secuenciación del producto de PCR de la proteína recombinante p16

Se repitió la mezcla de reacción con 50 μ l de volumen total en 2 tubos y con las mismas condiciones del termociclador. Se preparó el gel agarosa al 20% y se utilizó un peine más grande para lograr tener la banda de mayor tamaño. Para este pozo se colocó 40 μ l de cada tubo y 5 μ l de buffer de carga 4x. Se dejó correr a 82 volts aprox. 1 hora.

Obtenido el gel se procedió a cortar la zona donde está la banda deseada y se pesó en una báscula para purificarla utilizando el protocolo de un kit de purificación de gel agarosa (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit).

Teniendo el DNA puro de la proteína P16, se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop®). Se etiquetó el DNA puro y la mezcla de reacción y se completó a un volumen de 15 μ l para el DNA purificado y para la mezcla. Se agregó a cada uno 1 μ l de oligo FW. Se mandaron a secuenciar en el Instituto de Biotecnología (IBT) (Figura 7).

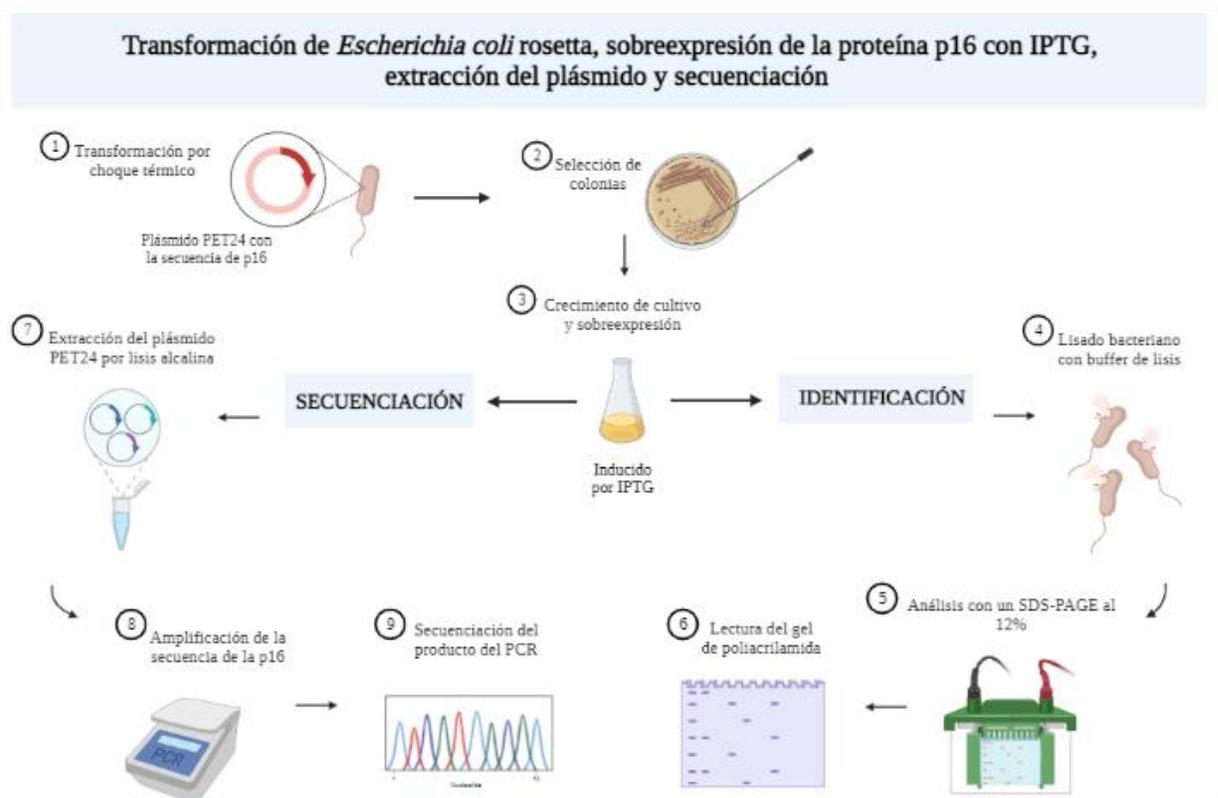


Figura 7. Esquema de la transformación de *E. coli* de la cepa *rosetta* con el plásmido PET24 codificado con la secuencia de p16, la sobreexpresión de la p16 con IPTG para su identificación con un SDS-PAGE y secuenciación. (Ilustración creada con la herramienta BioRender.com)

ANTIGENICIDAD DE LA P16 RECOMBINANTE MEDIANTE LA PRUEBA DE WESTERN BLOT

Inducción de las bacterias recombinantes p16 por IPTG

Se prepararon cuatro matraces, dos de 1 L y dos de 250 ml con 400 ml de medio LB en los dos matraces de 1 L y 100 ml de medio en los dos de 250 ml. Se esterilizaron en autoclave (Levadura: 2 g, NaCl: 2.4 g, peptona: 4 g, H₂O destilada: 400 ml). Se guardaron 2 alícuotas de 1.5 ml del cultivo como blanco para el biofotómetro.

Se sembró *E. coli* recombinante con p16 en 20 y 10 ml de LB, agregando 20 y 10 µL de kanamicina en c/u y se incubó a 37°C en agitación por 24 horas. Se verificó el crecimiento en ambos tubos con la *E. coli* recombinantes midiendo su densidad óptica.

Agregando 400 µl y 100 µl de kanamicina a los matraces, se añadieron los 20 y 10 ml de cultivo y se dejó incubar a 37°C. Se verificó la densidad óptica (OD600) utilizando el protocolo de uso del biofotómetro con cuarzo Starna cells. Inc® hasta que alcanzó una OD600 igual a 0.5.

Al llegar a 0.5, se procedió a inducir por Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se añadió 400 µl de IPTG/1 Molar en los matraces de 400 ml y 100 µl de IPTG/1 Molar en solo un matraz de 100 ml. Se incubó a 37°C toda la noche. Se volvió a medir la OD600 a las 16, 18 y 24 horas para verificar la densidad arriba de 1.0 en el cultivo. A las 18 horas habían alcanzado una OD600 arriba del 1.0. (Se guardaron 2 alícuotas de 1.5 ml del cultivo inducido y del no inducido para su uso como testigos del western blot).

Se colocaron 35 ml de los cultivos de cada matraz en tubos cónicos para centrífuga de 50 ml y se centrifugaron a 3000 gravedades por 15 minutos. Se decantó el medio y se diluyó a 1 ml de agua destilada.

SDS-PAGE y western blot antihistidina y con pool de sueros positivos y negativos de cabra

De los cultivos diluidos, se tomaron 250 µl en dos tubos agregando 500 µL de buffer de lisis proveniente de un kit de purificación de proteínas comercial. Se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 minutos. Las muestras (inducidas y sin inducir) se corrieron en geles SDS-PAGE al 15%* utilizando de amperaje constante de 20mA y voltaje variable a 60 min. Se usó un marcador de peso molecular de 250kd Biorad®. Los geles se tiñeron con azul de coomassie y se dejaron en agitación por media hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados por 10 min. con solución desteñidora (metanol, ácido acético y agua destilada) (*Ver Anexo 3).

Para realizar el WB* se emplearon membranas de polidivilino de fluoruro (PVDF) utilizando el buffer de transferencia para humedecer los filtros, la membrana, el gel SDS-PAGE y las esponjas. Se usó un voltaje constante de 100 volts con amperaje variable a 100 minutos. Antes de agregar los anticuerpos las membranas se bloquearon con leche descremada

(Svelty) al 5% y PBS 1x y se dejaron incubando una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1x (*Ver Anexo 4).

Las membranas se revelaron con tres anticuerpos primarios: ab antihistidina conjugado con HRP en una dilución 1/1000; un pool de sueros positivos y negativo en una dilución 1/500. (los sueros de cabras provienen de la granja “Carmen” en Querétaro y del rancho CEPIPSA, UNAM en CDMX y fueron donados por parte del banco de sueros de la FMVZ). Todos se llevaron a un volumen de 4 ml y se incubaron a 4°C, en agitación por 24 horas. Se agregó el conjugado (proteína G con HRP) en una dilución 1/3000 en 4ml, se dejó incubando media hora, en temperatura ambiente y en agitación (130 rpm). Se decantó el conjugado y se realizaron 8 lavados de 10 minutos con PBS tween 20. El revelado se hizo con 3,3 diaminobencidina preparada y 250 µl de H₂O₂ 3%. Ya preparada la mezcla se decantó en la membrana hasta que quedó completamente cubierta y se esperó un minuto.

Los sueros de cabras (10 positivos y 10 negativos) que se emplearon en los pools, provenían de las granjas “El Carmen” en Querétaro y del CEPIPSA, UNAM, en CDMX. Éstos se encontraban en el banco de sueros de la FMVZ y fueron seleccionados como positivos o negativos con base a un resultado previo realizado con el kit comercial caprine arthritis-encephalitis virus antibody test kit ELISA No.de catálogo 289-5 del laboratorio VMRD y siguiendo las especificaciones del fabricante.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA P16 RECOMBINANTE

Se utilizaron 2 técnicas para la purificación de proteínas, el kit comercial QIAprep Miniprep NI-NTA Spin Columns de Quiagen® y la cromatografía líquida de la proteína rápida (FPLC en sus siglas en inglés) con columna HIS-HRP.

Determinación de la expresión de la proteína p16 purificada por el kit QIAprep Miniprep NI-NTA Spin Columns a través de SDS-PAGE y Western blot antihistidina

Se realizó un pool de las muestras previamente inducidas con IPTG teniendo un total de 900ml de cultivo. Se centrifugó a 3000 gravedades por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 ml de buffer de lisis y se homogenizó. Se utilizó

el del kit de purificación de proteínas y se siguió el protocolo ya descrito en el kit (QIAprep Miniprep NI-NTA Spin Columns. Quiagen®). Se obtuvieron 2 ml de purificado y se cuantificaron usando un espectrofotómetro (nanodrop®). Se obtuvieron dos tubos con una concentración de 0.86 mg/ml y de 3.26 mg/ml cada uno. Se repitió este procedimiento para obtener la mayor cantidad de proteína pura necesaria.

Para observar la proteína recombinante se realizó un gel de SDS-PAGE al 15% empleando las condiciones previamente descritas. Se analizaron las proteínas purificadas y el lisado inducido como control. Además, se realizó un WB empleando los mismos anticuerpos y condiciones descintas previamente.

Determinación de la expresión de la proteína p16 purificada por FPLC (Cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad) a través de SDS-PAGE y Western blot antihistidina

Se realizó otro cultivo con medio Lb (Levadura: 2 g, NaCl: 2.4 g, peptona: 4 g, H₂O destilada: 400 ml) con kanamicina de 800 ml que fue inducido con IPTG y posteriormente lisando las bacterias con buffer de lisis. Se utilizaron 250 µl de bacteria lisada para la purificación con el FPLC (columna His-HRP) usando el programa UNICORN® 3.

Se obtuvo un pico de proteína que se unió a la columna en el tubo 9, y se guardó en una alícuota a -20°C. La proteína se cuantificó en 0.05mg/ml. Posteriormente se realizó un SDS-PAGE al 15% y un western blot con antihistidina y de pools de sueros de cabra positivos y negativos, con las condiciones que se describieron anteriormente.

EVALUACIÓN DE LAS PORINAS COMO ADYUVANTE PARA OBTENER UN SUERO HIPERINMUNE ANTI P16 EN CONEJO.

Protocolo de inmunización para la obtención de sueros hiperinmunes anti P16 en conejo.

Se realizó un protocolo de inmunización basado en el manual de laboratorio de inmunología (Aguilar Torrentera F, et al., 1994) para obtener anticuerpos policlonales utilizando a dos

conejos nueva Zelanda, hembras de 6 meses. Este protocolo fue revisado y autorizado por el Comité interno para el cuidado y uso de los animales (CICUA # protocolo 645).

Antes de la primera inoculación, se tomaron 2 ml de muestra sanguínea por venopunción de la vena central de la oreja. Se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 min., a 4°C para obtener el suero que se fraccionó en volúmenes de 200 µl y se almacenó a -20°C. En cada inmunización se repitió este procedimiento para evaluar la producción de anticuerpos. Se utilizaron dos adyuvantes para la inmunización: uno con adyuvante completo e incompleto de Freund (Tabla 1.) y el otro con porinas Omp C y Omp F purificadas de *Salmonella entérica* serovar *Typhi* (Tabla 2.), que fueron donadas por el Dr. Constantino López Macías.

Los cuadros 5 y 6 indican los protocolos de inmunización utilizando ambos adyuvantes:

Cuadro 5. Protocolo de inmunización de conejo para antígenos solubles utilizando Adyuvante completo e incompleto de Freund.		
Inyección No.	Tiempo (día)	Dosis y vía
1	0	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada + 500 µg de Adyuvante completo de Freund. V.I: SC
2	15	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada + 500 µg de Adyuvante incompleto de Freund. V.I: SC
3	30	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada + 500 µg de Adyuvante incompleto de Freund. V.I: SC
4	45	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada V.I: SC

5	60	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada V.I: SC
Sangrado	76	Sangrado en blanco.

Cuadro 6. Protocolo de inmunización de conejo para antígenos solubles utilizando porinas como adyuvante		
Inyección No.	Tiempo (día)	Dosis y vía
1	0	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada + 500 µg de porina. V.I: SC
2	15	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada + 500 µg de porina. V.I: SC
3	30	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada + 500 µg de porina. V.I: SC
4	45	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada V.I: SC

5	60	100 µg p16 pura diluida en 500 µg de agua destilada V.I: SC
Sangrado	76	Sangrado en blanco.

Para la obtención del suero hiperinmune, se realizó un sangrado en blanco por medio de una punción cardiaca, con la coneja previamente anestesiada con Xilacina a una dosis de 2 mg/kg y Ketamina a 25mg/kg (NOM-033-ZOO-1995).

La sangre obtenida fue centrifugada a 4,000 rpm, durante 10 minutos a 4°C para separar el suero. Se fraccionó en volúmenes de 1.5 ml y se mantuvo a -20°C.

Con el suero obtenido se realizó WB empleando la p16. Para ello, se realizó un gel de SDS-PAGE al 15% y se transfirió a en una membrana de polidivilino de fluoruro (PVDF), en las condiciones previamente descritas, para observar si ambos protocolos eran funcionales (Figura 15).

Para determinar la dilución óptima del SH se realizó un western blot de la siguiente forma:

Una membrana previamente transferida con la p16 se recortó en 8 tiras delgadas separando las muestras una de la otra y se colocaron en una placa con canales. Se bloquearon las membranas con leche Svelty® al 5% y PBS 1x, se dejaron incubando una hora a temperatura ambiente (20-25°C) y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1x.

En los cuatro primeros canales (1, 2, 3 y 4) se utilizó como anticuerpo primario el suero de conejo de la 4ta inmunización con porinas y en los últimos cuatro canales (5, 6, 7, 8) se utilizó suero de conejo basal. En los carriles 1, 2 y 5, 6 se empleó una dilución 1/1000 en 4ml; en

los canales 3, 4 y 7, 8, se utilizó una dilución 1/2000 en 4 ml. Se incubaron todas las tiras de membrana a 4°C, en agitación por toda la noche.

Al día siguiente, se decantó el anticuerpo primario y se realizaron 8 lavados de PBS-tween20 de 10 minutos cada uno. Terminado los lavados, se agregó el conjugado (proteína A con HRP) en una dilución 1/4000 en 4 ml en los canales 1, 3 y 5, 7. En los canales 2, 4 y 6, 8 se utilizó una dilución de 1/3000 en 4ml. Se dejó incubar a temperatura ambiente y en agitación por una hora. El revelado fue utilizando 3,3-diaminobencidina (Aldrich, D12384-5G).

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE BACTERIAS *ESCHERICHIA COLI ROSETTA* TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO PET24 QUE EXPRESA LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA P16 DE LVPR

El resultado obtenido de la SDS-PAGE del lisado de las *E. coli* rosetta transformadas se observa en la figura 9, donde se aprecia una banda gruesa arriba del peso marcado en 15 kDa correspondiendo aproximadamente al peso de 16 kDa de la proteína (Figura 8).

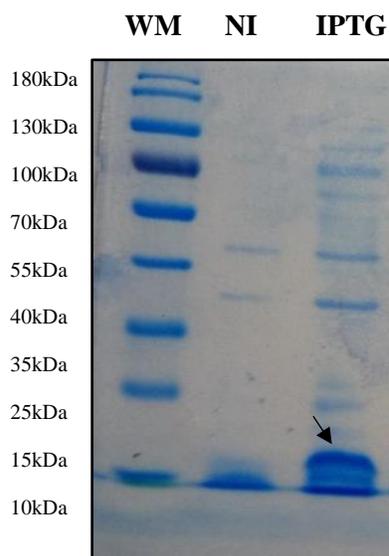


Figura 8. Gel SDS PAGE 12% teñido con azul comassie. Carril 1: MPM (Prestainer ladder protein, #26616 Thermofisher); carril 2: cepa *E.coli rosetta* no inducida (NI); carril 3: cepa *E.coli rosetta* inducida con IPTG. Se una banda que corresponde aproximadamente al peso de 16kDa de la proteína.

Al comparar las proteínas recombinantes inducidas con IPTG de la cepa *rosetta* y de la cepa BL21, usando el software semicuantitativo ImageJ, obtuvo un porcentaje de intensidad relativa mayor de la cepa *rosetta* a comparación con la BL21 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Cuantificación de la proteína p16 de la cepa <i>rosetta</i> y b121 por gel SDS-PAGE con el software de análisis Imagej®		
Cepas	Cuantificación de densidad de los pixeles	% Intensidad relativa
<i>Rosetta</i> NI	2981.702	100
<i>Rosetta</i> con IPTG	31257.279	1048.3
B121 NI	12910.359	100
B121 con IPTG	79501.784	615.7

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS

Extracción y amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína recombinante p16

El producto de PCR dio el peso esperado de 438pb, correspondiente a la p16 de LVpR (Figura 9).

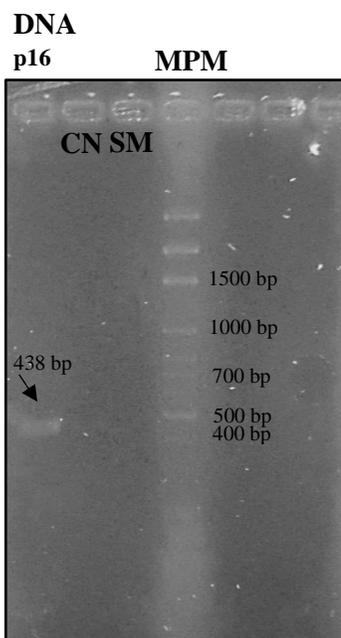


Figura 9. Gel de agarosa al 2.0% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: producto de PCR obtenido al amplificar el plásmido PET24 que codifica para la proteína p16 (DNAp16). Se observa una banda entre el peso 400-500bp, que corresponde al peso esperado 438bp; Carril 4: marcador de peso molecular (MPM) de 100bp-3000bp (pares de bases), marca Axygen®. Carriles 2 y 3: control negativo (CN) y sin muestra (SM).

Secuenciación del producto de PCR de la proteína recombinante p16

Se corrió un segundo gel para obtener el producto y enviar a secuenciar. Los resultados mostraron un 97% de relación con el genoma de VAEC con 240/247 de nucleótidos. (Blast, NCBI). Lo que confirma la correcta inserción del gen que codifica para la proteína recombinante P16 en el plásmido (Figura 10).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
418 bits(226)	1e-112	240/247(97%)	4/247(1%)	Plus/Plus
Query 5	TCCGTGAGCTCG--AAATGTATCAAGCATGCATG-AAGATAAAAGTTCGACTCAGAGGGG			61
Sbjct 568	TCC-TGAGCTCGAAAAATGTATCAAGCATGCATGCAAGATAAAAGTTCGACTCAGAGGGG			626
Query 62	AGCACTTGACAGAAGGAAATTGTTTATGGTGCCTTAAACATTAGATTACATGTTTGAGG			121
Sbjct 627	AGCACTTGACAGAAGGAAATTGTTTATGGTGCCTTAAACATTAGATTACATGTTTGAGG			686
Query 122	ACCATAAAGAGGAACCTTGGACAAAAGTAAAATTTAGGACAATATGGCAGAAGGTGAAGA			181
Sbjct 687	ACCATAAAGAGGAACCTTGGACAAAAGTAAAATTTAGGACAATATGGCAGAAGGTGAAGA			746
Query 182	ATCTAACTCCTGAGGAGAGTAACaaaaaaraCWTATGTCTTTGCAGGCCACATTAGCGG			241
Sbjct 747	ATCTAACTCCTGAGGAGAGTAACAAAAAAGACTTTATGTCTTTGCAGGCCACATTAGCGG			806
Query 242	GGCTAAT 248			
Sbjct 807	GTCTAAT 813			

Figura 10. Secuenciación del DNA purificado de la p16. Se obtuvo un 97% de relación con el genoma del virus de AEC con 240/247 de nucleótidos. (Blast, NCBI).

ANTIGENICIDAD DE LA P16 RECOMBINANTE MEDIANTE LA PRUEBA DE WESTERN BLOT

Inducción de las bacterias recombinantes p16 por IPTG

La electroforesis y el WB demuestran la presencia de bandas de aproximadamente 16kDa, coincidentes con la figura 12, donde se observa una banda ancha que coincide con el peso esperado de la proteína p16 recombinante inducida. En el western blot se observa la banda que reconoció el anticuerpo antihistidina contra la cola de histidina que posee la proteína recombinante. Esta también fue reconocida por el pool de sueros de cabras positivos mientras que con el pool de sueros de cabra negativos no hubo reconocimiento de la p16 recombinante (Figura 11).

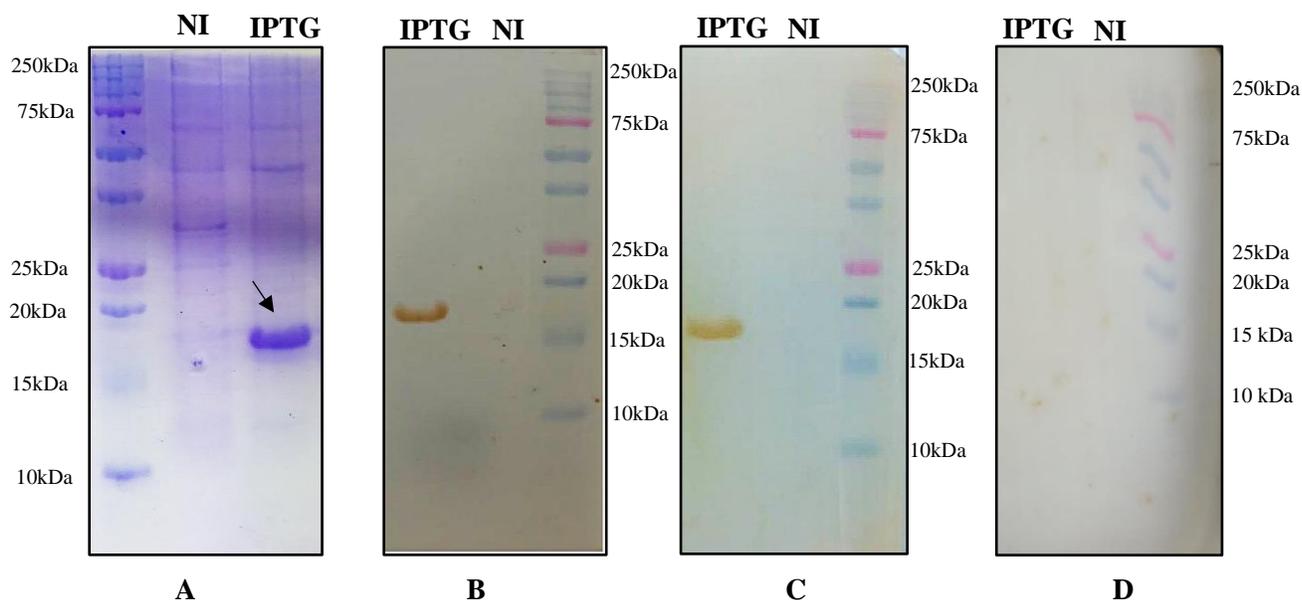


Figura 11. A) Expresión de la proteína p16 en SDS-PAGE 15% teñido con azul comassie. Se observa en la primera columna el marcador de peso (250kd, Biorad®), NI: cepa no inducida, IPTG: cepa inducida donde se observa una banda ubicada aproximadamente en el peso de p16 (16 kDa). B) Reconocimiento de la proteína p16 a través de Western Blot (WB) de la cepa E. coli contra la cola de histidina que posee la p16 recombinante. IPTG: se observa una banda gruesa de la proteína inducida. NI: no se observa presencia de banda. C) WB con pool de sueros de cabras positivas. IPTG: Se observa la expresión de la proteína recombinante en los sueros positivos. D) WB con pool de sueros negativos no hay presencia de bandas.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA P16 RECOMBINANTE

Determinación de la expresión de la proteína p16 purificada por el kit QIAprep Miniprep NI-NTA Spin Columns a través de SDS-PAGE y Western blot antihistidina

Se obtuvo con éxito la proteína recombinante purificada, en el gel de poliacrilamida se observa una banda en el peso de 16 kDa. En el western blot antihistidina hubo reconocimiento de la proteína p16 purificada, en la membrana de PVDF se observa una banda en el peso de 16 kDa. Se observan dos bandas por arriba del peso esperado, que no se detectaban antes de la purificación (Figura 12).

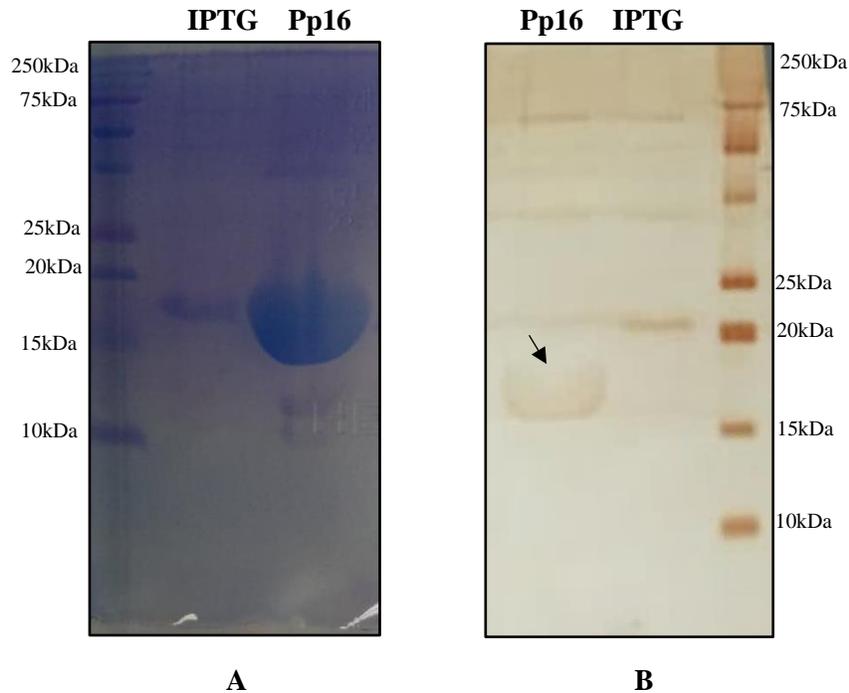


Figura 12. A) Purificación de p16 de matriz por kit comercial en SDS-PAGE 15% tinción azul comassie. En la primera columna está el marcador de peso (250kDa, Biorad®), **IPTG:** cepa inducida y sin purificar de la bacteria recombinante donde se aprecia una banda en el peso aproximado de la proteína p16, **Pp16:** proteína p16 purificada donde se aprecia una banda más gruesa ubicada en el peso aproximado de p16. **B)** Reconocimiento de la p16 purificada a través de WB antihistidina. **Pp16:** Se reveló una banda gruesa a un peso aproximado de 16kDa que corresponde a la proteína de matriz.

Para determinar el **reconocimiento de la proteína p16 purificada por un pool de sueros positivos y negativos al LvPR, se realizó un WB.** La proteína p16 purificada fue reconocida por el pool de sueros de cabras positivos. Se observa una banda gruesa que corresponde al peso de 16 kDa. Aquí también se observan unas bandas arriba de la proteína purificada. Con el pool de sueros negativos no se observaron bandas en la membrana, a lo que se concluye que no hubo ningún reconocimiento con los sueros negativos y nos determina su antigenicidad al solo ser reconocida por los sueros positivos de la enfermedad (Figura 13).

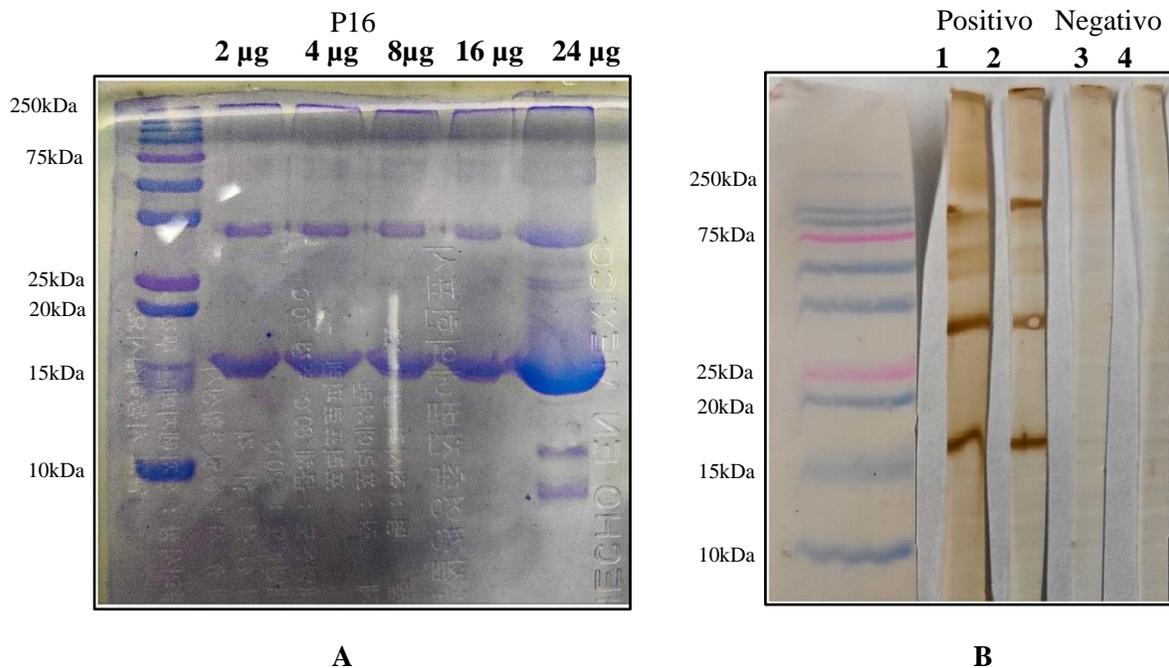


Figura 13 A) Expresión de la proteína p16 purificada por kit comercial en SDS-PAGE 15% teñido con azul comassie. Se observa en la primera columna el marcador de peso (250kDa, Biorad®), En las columnas 2, 3, 4 y 5 se aprecian 2 bandas marcadas en un peso aprox de 36kDa y 27kDa en diferentes concentraciones (2 µg, 4 µg, 8 µg y 16 µg), en la columna 6 se aprecian más bandas con una concentración de proteína de 24 µg. **B)** Reconocimiento de la proteína p16 purificada por kit comercial con un pool de sueros de cabras positivos y negativos mediante Western Blot. Columnas 1 y 2; sueros de cabra positivos, columnas 3 y 4; sueros de cabra negativos.

Determinación de la expresión de la proteína p16 purificada por FPLC (Cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad) a través de SDS-PAGE y Western blot antihistidina

Después de realizar la purificación utilizando el FPLC, se obtuvo un pico de proteína pura en el tubo 9. Esta proteína se cuantificó y se utilizó para correr un gel de poliacrilamida. En la figura 14 se observó la p16 inducida con IPTG sin purificar con la presencia de una banda más gruesa arriba del peso 15 kDa del marcador que sería el peso aproximado de la proteína (16 kDa). En el primer pozo se colocó la proteína purificada donde se observa una banda por encima del peso 15 kDa y otra banda por el peso 36 kDa del marcador.

Para determinar el reconocimiento de la proteína p16 purificada por un pool de sueros positivos y negativos al LvPR se realizó un WB. Se reveló la proteína inducida, sin embargo, no se observa ninguna banda que corresponda a la proteína purificada (Figura 14).

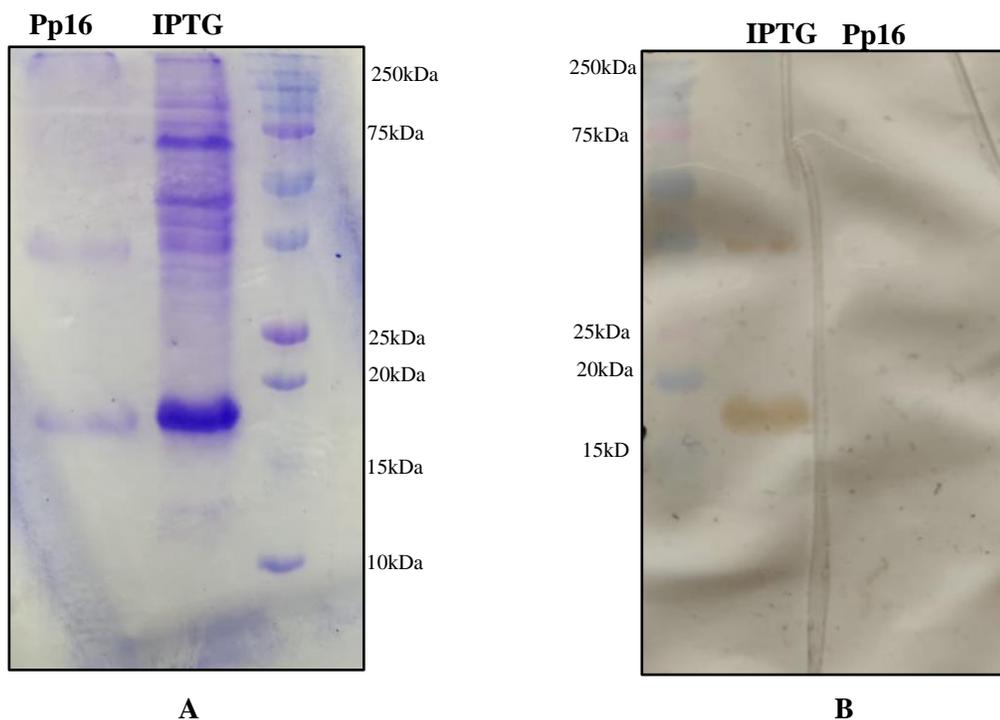


Figura 14. A) Purificación de p16 de matriz por FPLC en SDS-PAGE 15% tinción azul comassie. **Pp16:** proteína p16 purificada donde se aprecia una banda ubicada en el peso aproximado de p16. **IPTG:** cepa inducida y sin purificar de la bacteria recombinante donde se aprecia una banda en el peso aproximado de la proteína p16. En la tercera columna está el marcador de peso. (250kDa, Biorad®) **B)** Reconocimiento de la p16 purificada a través de WB antihistidina. **IPTG:** cepa inducida donde se observan dos bandas con un peso aproximado de 37kDa y 16kDa. **Pp16:** No se observó ninguna banda que correspondiera a la p16 purificada.

Debido a que no se obtuvo suficiente proteína, ya no se corrieron los WB con los sueros de cabra. Y se decidió continuar con la proteína purificada por kit.

EVALUACIÓN DE LAS PORINAS COMO ADYUVANTE PARA OBTENER UN SUERO HIPERINMUNE ANTI P16 EN CONEJO.

Obtención de sueros hiperinmunes anti P16 en conejo.

Después de aplicar ambos protocolos podemos observar que tras la cuarta inmunización ambos adyuvantes generaron anticuerpos capaces de reconocer la p16. La intensidad de las bandas obtenidas fue semejante, lo que nos permite deducir ambos esquemas de inmunización funcionaron (Figura 15).

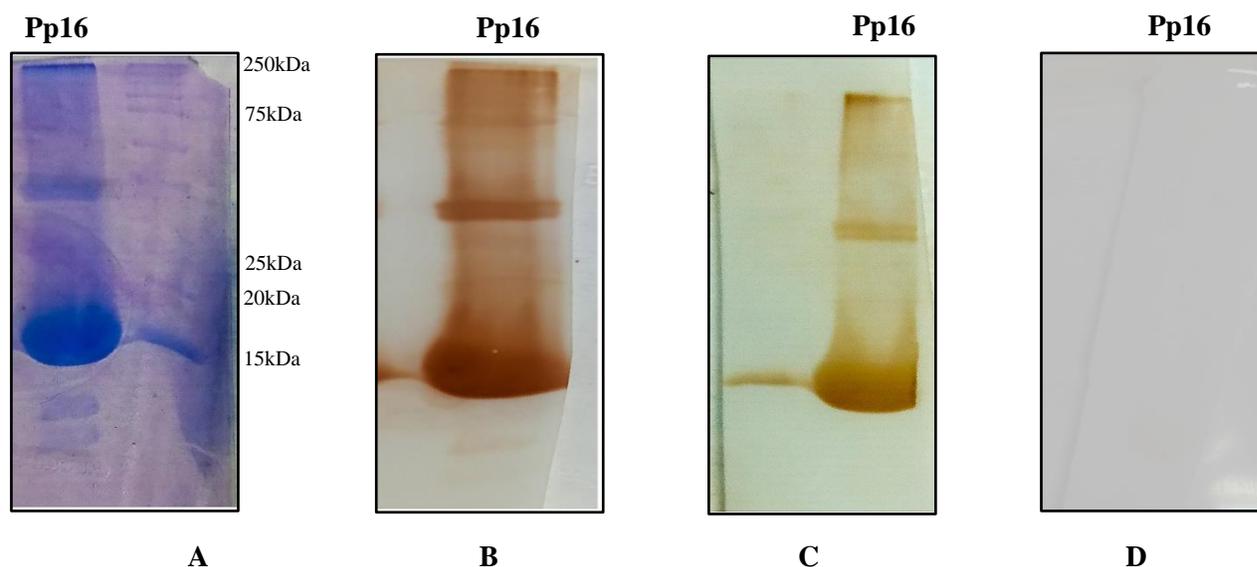


Figura 15. Reconocimiento inmunológico de anticuerpos policlonales de conejo utilizando adyuvante de Freund y porinas. **A)** Expresión de la proteína purificada p16 recombinante en SDS-PAGE 15% teñido con Azul de Coomassie. **Pp16:** proteína purificada. En la segunda columna se observa el marcador de peso molecular. (Marcador de peso Biorad® de 250kDa). **B)** Reconocimiento de la proteína p16 purificada a través de Western blot usando suero hiperinmune a partir de la 4ta inmunización con adyuvante de Freund. **C)** Reconocimiento de la proteína p16 purificada a través de Western blot usando suero hiperinmune a partir de la 4ta inmunización con porinas como adyuvante. **D)** Reconocimiento de la proteína p16 purificada a través de Western blot usando suero de conejo basal.

Como se observa en la figura 16, el SH de conejo inmunizado con porina puede detectar la p16, en la dilución 1:2000, empleando el anticuerpo secundario a una dilución 1:3000; por lo que este suero podría ser utilizado eficazmente en futuros estudios. En los carriles donde se agregó el suero basal del conejo no se observa ningún reconocimiento. Se observó también otras bandas por arriba de la banda gruesa al igual que los resultados anteriores al purificar la proteína (Figura 16).

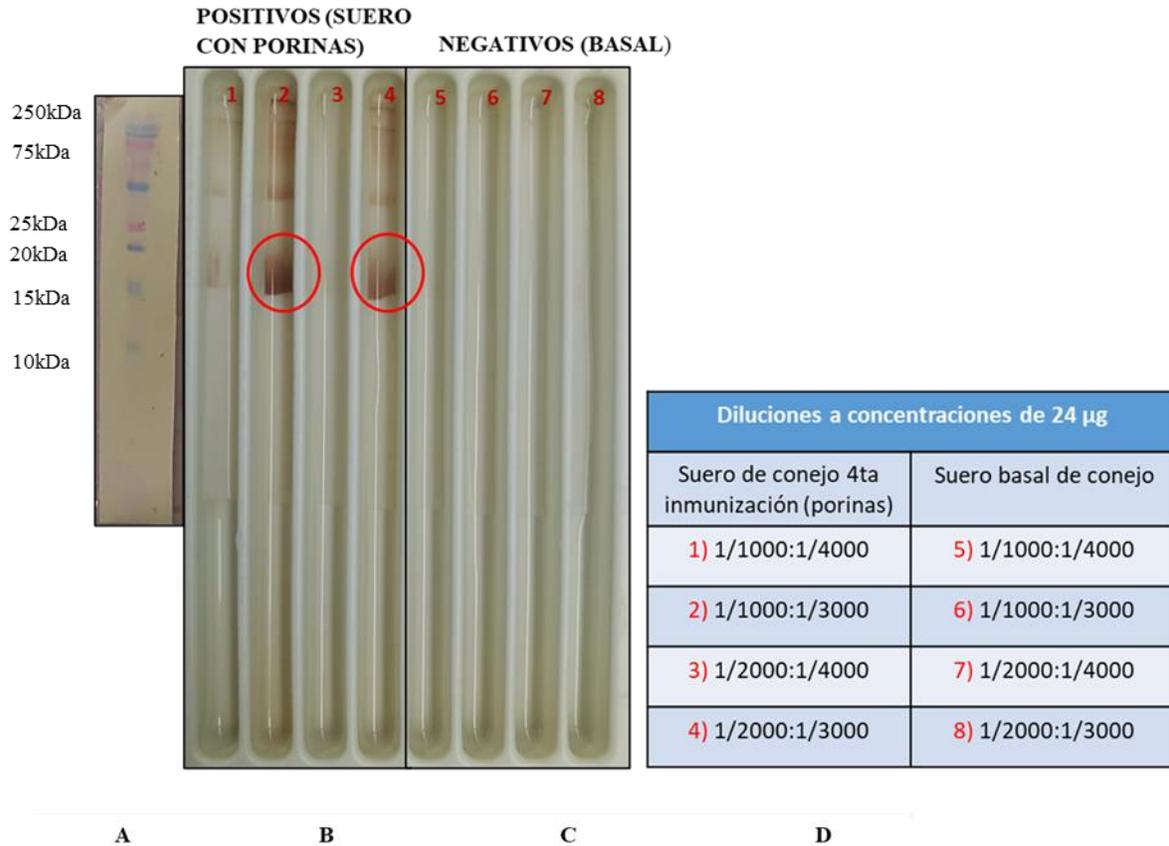


Figura 16. Reconocimiento inmunológico de la proteína p16 purificada con los anticuerpos policlonales de conejo a través de Western Blot. **A)** Marcador de peso molecular. (Marcador de peso Biorad® de 250kd). **B)** Reconocimiento de la proteína p16 purificada a través de Western blot usando suero hiperinmune de conejo a partir de la 4ta inmunización con porinas. En el carril 2 y 4 se observaron bandas en el peso aproximado de 36kDa y 16kDa, esta última corresponde al peso de la proteína recombinante de matriz. En el carril 1 y 3 no aprecia bandas definidas. **C)** Reconocimiento de la proteína p16 purificada a través de Western blot usando suero basal de conejo. En ningún carril se observaron bandas. **D)** Tabla de diluciones con una concentración de proteína de 24 µg. Se utilizaron anticuerpos primarios (suero hiperinmune y basal de conejo) y secundarios. (proteína A)

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se optimizaron las condiciones para la obtención de inmunorreactivos para el diagnóstico de LvPR (antes conocido como Artritis Encefalitis Caprina). Para ello se emplearon bacterias *Escherichia coli* BL21 previamente transformadas con el plásmido PET24 que expresaban la secuencia que codifica para la proteína p16.

Como primer paso se realizó la extracción del plásmido para transformar bacterias *E.coli rosetta*, se amplificó por PCR la región codificante para p16 y se determinó que correspondía al peso esperado de 438pb. Posteriormente se mandó a secuenciar y el resultado se comparó con los datos p16 del GenBank (secuencia M33677.1), mediante el programa Blast, mostrando una homología del 97% con la secuencia de la p16 del virus de la Encefalitis de Artritis Caprina del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Lo anterior coincide con estudios previos en los que amplifican los genes gag y pol para el diseño de herramientas moleculares (Saltarelli M, et al. 1990, Norma, 2011).

Una vez corroborado que la secuencia correspondía a la proteína esperada, se procedió a comparar el rendimiento obtenido con la cepa *rosetta* en comparación con la cepa BL21, mediante el uso del programa semicuantitativo Imagej donde se observó que la cepa *rosetta* generó una mayor producción de la proteína recombinante. En los estudios de Tegel H, et al. demuestran que esta aumenta la producción de proteínas por la coexpresión de genes que codifican codones raros comúnmente utilizados por los eucariotas, pero rara vez utilizados en *E. coli*, (Tegel H, Tourle S, Otosson J, Persson A, 2009). Dado que la proteína expresada corresponde a un lentivirus y estos usan un gran número de codones raros (Kingsman, Alan John; Kim, et.al. 2017), podemos suponer que se optimizó su expresión al emplear la cepa *rosetta*.

Por otro lado, durante la purificación de la proteína por el método del Kit, dio un mayor rendimiento que el HPLC, por lo que optamos por seguir los experimentos con esta metodología. Sin embargo, durante la purificación con ambos métodos probados se observa un segundo bandeo en un peso de aproximadamente 36 KDa. Llama la atención que esta otra banda no es reconocida por los sueros negativos de cabra y si por los positivos, por lo que se infiere que esta podría corresponder a diversas causas como una unión inespecífica por hexahistidina (His6), una dimerización de la proteína (Wu, JW & Filutowicz, Marcin, 1999) o cuerpos de inclusión (agregados de la proteína) (Lara A, 2011). Sin embargo, es importante destacar que esta otra banda no es reconocida por los sueros negativos de cabra, lo que supone que no se debe a una contaminación y dado que los sueros positivos si la detectan, inferimos

que podría tratarse de un agregado o dimerización de la p16; sin embargo, se tendría que realizar una secuenciación de la proteína para demostrarlo.

Debido a que no fue posible eliminar la banda, ni secuenciarla, se decidió hacer la inmunización de los conejos a fin de evaluar el uso de las porinas como adyuvante; y poder contar con antisuero específico contra la p16.

En la elaboración del SH se pudo demostrar que las porinas son una opción para ser usados como adyuvantes, como se ha demostrado en estudios previos como el de Galindo C. 2021 quien empleó a las porinas en la vacunación contra PED en cerdas gestantes y demostró un aumento en el título de anticuerpos tanto en suero como en calostro. (Galindo C. 2021). Esto abre la puerta a un nuevo adyuvante en la producción de antisueros, ya que tanto los conejos inmunizados con ACF como los que recibieron porinas produjeron una adecuada respuesta a la inmunización. Si bien en el WB se observa una banda más débil en las porinas, esto podría optimizarse haciendo inmunizaciones con más porina o un mayor número de veces; o simplemente utilizar el SH en una dilución menor. Otras ventajas que tiene el usar las porinas como adyuvante que estas no causan daño al animal en comparación con los adyuvantes completos e incompletos de Freund (Bustos M. et al. 2005), son más económicas y de fácil adquisición ya que se producen en el país.

Finalmente, la evaluación de la proteína recombinante p16 como un posible antígeno para el serodiagnóstico de la enfermedad de lentivirus caprino tuvo un reconocimiento exitoso con el suero hiperinmune anti p16 al detectarse una banda gruesa que corresponde al peso de la proteína purificada hasta en diluciones 1/4000.

Los resultados del presente trabajo sientan las bases para la producción de la p16 a mayor escala, y al contar con un suero hiperinmune, será más fácil ofrecer las pruebas de serodiagnóstico como la ELISA, el luminex (que ya han sido estandarizadas y validadas en nuestro grupo de trabajo) como un servicio de diagnóstico a gran escala. Además, con estos reactivos se podrán implementar otras metodologías como la prueba rápida de inmunocromatografía, que permitiría un diagnóstico en campo.

CONCLUSIÓN

La amplificación y secuenciación demostró la presencia de la p16 recombinante en las cepas *E.coli* trabajadas.

Se obtuvo una mayor cantidad de proteína utilizando la cepa *rosetta* en comparación con la BL21, lo que nos da una alternativa para una mayor producción de p16 recombinante.

Se obtuvo mayor cantidad de proteína purificada con el kit comercial en comparación con el FPLC.

Se obtuvo un SH con un alto título de anticuerpos contra la proteína.

Las porinas empleadas como adyuvante mostraron una eficiencia comparable con el adyuvante de Completo de Freund, pero con menos efectos adversos en el animal.

PROSPECTIVAS

Utilizar los inmunoreactivos obtenidos en la estandarización de pruebas serológicas como la inmunocromatografía.

Implementar la prueba de luminex a gran escala, para realizar estudios epidemiológicos en diferentes Estados de la República mexicana.

ANEXOS

ANEXO 1

SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO

Solucion I. Extracción de plásmido

Tris-HCL pH 8.0 25 mM	0.30285 g
EDTA 50 mM	1.4612 g

Solucion II. Extracción de plásmido

0.2 NaOH (2.8 ml de NaOH al 1M)	3.9997 g/mol
SDS 1% (1.4 ml de SDS al 10%)	1 g/10 ml al 10%

Solucion III. Extracción de plásmido

5 M KOAC pH 4.8	1 g 5M de KOAC/2 ml H ₂ O
Ácido acético 11.5%	(v/v) 44g en 100 ml

Buffer de elución

Tris pH 8.5 10 mM	0.012114 g/100 ml
-------------------	-------------------

Precipitación del ADN plasmídico

Isopropanol	500 µl
Etanol 70%	500 µl

*Las tres soluciones deben permanecer en refrigeración a 4°C

ANEXO 2

SOLUCIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR Master Mix (2x)

H2O	20.25 µl
MM2x	25 µl
Primer FW	1 µl
Primer RV	1 µl
DMSO	0.75 µl
DNA	2 µl
*50 µl totales de mezcla de reacción en un microtubo de 200 µl	

ANEXO 3

SOLUCIONES PARA LA ELECTROFORESIS

Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%	
Amortiguador de corrida	
Glicina 0.192 M	14.4 g
Tris Base 0.025 M	3 g.
SDS 0.1%	1 g
dH2O	cbp 1 L
*En 300 ml de H2O destilada agregar primero glicina, después adicionar el Tris Base y por último el SDS. Esperar la homogeneización y aforar a 1 L. Mantener a refrigeración 4°C	
SDS 10%	
SDS	1 g
dH2O	cbp 10 ml
APS 10%	
Persulfato de amonio	0.1 g

dH2O cbp 1 ml

*Una vez preparado se mantiene en congelación -20 °C

Amortiguador gel resoledor

Tris Base 1.5 M 9.085 g

SDS 0.20 g

dH2O 50 ml

*Ajustar pH a 8.8 con HCl y mantener a refrigeración 4°C

Amortiguador gel concentrador

Tris Base 1M 3.03 g

SDS 0.20 g

dH2O 50 ml

*Ajustar pH a 6.8 con HCl y mantener a refrigeración 4°C

Solución de tñido

Azul de Coomassie R-250 2.5 g

Ácido Acético 50 ml

Etanol 96% 450 ml

dH2O 500 ml

Solución para desteñir

Metanol 10%

Ácido Acético Glacial 10%

dH2O 80%

ANEXO 4

SOLUCIONES PARA EL WESTERN BLOT

Solución Amortiguador de Transferencia	
Tris base	4.8 g
Glicina	23g
Metanol 96%	320 ml
SDS 10%	100 µl
Agua destilada	1.6 L
PBS 10X	
Na ₂ HPO ₄	14.2 g
NaH ₂ PO ₄	6.9 g
NaCl	87.5 g
dH ₂ O	cbp 1 L
PBS 1X	
PBS 10X	100 ml
dH ₂ O	900 ml
*Ajustar pH a 7.2	
PBS Tween	
Tween 20	500 µl
PBS 1X	cbp 1 L
Solución de bloqueo	
Leche descremada en polvo 5 %	50 mg
PBS 1X	cbp 5 ml
Solución de lavado de 2do ab	
Tween 20	500 µl
PBS 1X cbp	500 ml

Solución de revelado

PBS 1x	4.5 ml
Diaminobencidina preparada*	250 µl
H2O2 3%	250 µl
*0.1 g de diaminobencidina y 10 ml de HCL al 10 N	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencias serológicas de LvPR en cabras, reportadas en diferentes estados de la república.

Figura 2. A) Estructura del virus de Artritis-encefalitis caprina. B) Organización genética.

Figura 3. Ciclo de replicación viral de LvPR.

Figura 4. Representación esquemática de la transmisión del VAEC.

Figura 5. Esquema general para la obtención de un DNA recombinante para la sobreexpresión de una proteína.

Figura 6. Esquema de extracción del plásmido por lisis alcalina.

Figura 7. Esquema de la transformación de E. coli de la cepa *rosetta* con el plásmido PET24 codificado con la secuencia de p16, la sobreexpresión de la p16 con IPTG para su identificación con un SDS-PAGE y secuenciación.

Figura 8. Gel SDS PAGE 12% teñido con azul comassie.

Figura 9. Gel de agarosa al 2.0% teñido con bromuro de etidio.

Figura 10. Secuenciación del DNA purificado de la p16. (Blast, NCBI).

Figura 11. A) Expresión de la proteína p16 en SDS- PAGE 15% teñido con azul comassie. B) Reconocimiento de la p16 por western blot. C) Western blot con pool de sueros de cabras positivas. D) Western blot con pool de suero de cabras negativas.

Figura 12. A) SDS-PAGE 15% proteína p16 purificada. B) WB antihistidina (HRP).

Figura 13. A) SDS- PAGE 15% y western blot de p16 purificada con pool de sueros de cabras positivos y negativos a artritis encefalitis caprina. B) Se revela el reconocimiento inmunológico en el pool de sueros positivos y de sueros de cabras negativos.

Figura 14. SDS- PAGE 15% y western blot con purificado de la p16 por FPLC.

Figura 15. Reconocimiento inmunológico con los anticuerpos policlonales de conejo, utilizando adyuvante de freund y porinas.

Figura 16. Reconocimiento inmunológico de la proteína p16 purificada con los anticuerpos policlonales de conejo a través de western blot.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Zonas donde se desarrolla la producción con caprinos en nuestro país. (Ducoing-Watty 2011)

Cuadro 2. Principales funciones del genoma viral y proteínas codificadas.

Cuadro 3. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de LvC y su propósito.

Cuadro 4. Pruebas diagnósticas de LvC, ventajas y desventajas.

Cuadro 5. Protocolo de inmunización de conejo para antígenos solubles utilizando adyuvante de Freund completo e incompleto.

Cuadro 6. Protocolo de inmunización para antígenos solubles utilizando adyuvante Porina.

Cuadro 7. Cuantificación de la proteína p16 de la cepa *rosetta* y b121 por gel SDS-PAGE con el software de análisis Imagej®

REFERENCIAS

1. Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los estados unidos mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. SEGOB, México, DOF:29/11/2018 [citado: 24/08/22]. Disponible en: www.dof.gob.mx
2. Aguilar Torrentera F, Castro Mussot Ma. E, Cedillo Barrón L, Chapa Ruiz Ma. R, et al., (1994). Manual de laboratorio de inmunología. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F.
3. Andréia P. Turchetti, Juliana J. Paniago, Luciana F. da Costa, Juliano C.M. da Cruz, Gissandra F. Braz, Aurora M.G. Gouveia, Tatiane A. Paixão, Renato L. Santos, Marcos B. Heinemanna, (2013). Distribution of caprine arthritis encephalitis virus provirus, RNA, and antigen in the reproductive tract of one naturally and seven experimentally infected bucks. *Theriogenology*, 933-939.
4. Balbin, M. M., Lertanantawong, B., Suraruengchai, W., & Mingala, C. N. (2017). Colorimetric detection of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) through loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with gold nanoprobe. *Small Ruminant Research*, 147, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.021>
5. Barquero, N., Domenech, A. & Arjona, A., (2013). Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Research in Veterinary Science*, 94, pp.817–819. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.004>.
6. Bernagozzi Jorge A., Barragán Javier H. (2014) Adyuvantes oleosos: definición, características, tipos de respuesta inmune que engendran, reacciones adversas. *Revista del colegio de veterinarios de Buenos Aires (CVPBA)*. N°59 ISSN 2250-5040
7. Bertolotti, L.; Mazzei, M.; Puggioni, G.; Carrozza, M.L.; Dei Giudici, S.; Muz, D.; Juganaru, M.; Patta, C.; Tolari, F.; Rosati, S. (2011). Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. *J. Gen. Virol.*, 92; 1923-1929.

8. Blacklaws, B.A., (2012). Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35, pp.259–269. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237012> [Accessed March 8, 2013].
9. Bustos M. F, Mora P. NJ y Valdivieso P. SJ. (2005) Las porinas como adyuvante de una vacuna inactivada contra Newcastle en pollos de engorde. *Rev Med Vet.*; (9): 37-45.
10. Carrenõ, J. M. *et al.* (2017) ‘c vaccination: A randomized clinical trial’, *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0178669.
11. Cervantes-Barragán, L. *et al.* (2009) ‘TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to Salmonella typhi antigens’, *European Journal of Immunology*. doi: 10.1002/eji.200838185.
12. Coffin J M. (1996) Retroviridae: the viruses and their replication. In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, Chanock R M, Melnick J L, Monath T P, Roizman B, Straus S E, editors. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers
13. Cork, L. C. *et al.* (1974) ‘Pathology of viral leukoencephalomyelitis of goats’, *Acta Neuropathologica*, 29(4), pp. 281–292. doi: 10.1007/BF00685482.
14. Cunha, AKH., Soares, R., Da Silva, MFT. (2001). Lentivirus de pequeños rumiantes (CAEV y Maedi-Visna): revisión y perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.* 21(3):87-97
15. De Andrés, D. *et al.*, (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary microbiology*, 107, pp.49–62.
16. De la Luz J, Ducoing A, Ramírez H, Gómez L, Tufiño C, Cabrera E, *et al.* Prevalence, molecular detection, and pathological caracterizacion of small ruminant lenviruses in goats from México. *Small Ruminant Research*. 2021 sep 1;202
17. Ducoing, A. E. (2007) *Introducción a La Caprino Cultura*, *Universidad Nacional Autónoma de México*. doi: 10.1055/s-2001-16596.
18. East, N. E. *et al.* (1987) ‘Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies.’, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190(2), pp. 182–6. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.11.012.

19. Escareño L., Salinas-Gonzales H., Wurzinger M., Iñiguez L, Solkner J., Meza-Herrera CA. (2013). Dairy goat production systems: Status quo, perspectives and challenges. *Tropical Animal Health and Production*, 45: 17-34.
20. Galindo Castañeda Lourdes M. (2021). Análisis de la eficacia inmunoestimulante del extracto dializable leucocitario y las porinas omp c y omp f de *salmonella typhi* en la inmunización contra la diarrea epidémica porcina. Doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal. Fmvz, unam. México, CDMX
21. Gilles, Q. & Robert, V., (1999). Caprine Arthritis Encephalitis Virus (Retroviridae). A. Granoff & R. G. Webster, eds. *Encyclopedia of Virology (second edition)*, pp.223–229.
22. Glaria, E. I. (2015). Base genética del tropismo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3. Tesis doctoral. Iruña, Pamplona: Universidad Pública de Navarra.
23. Grego, E. et al., (2005). Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 106, pp.179–185. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778023> [Accessed August 1, 2013].
24. Guerrero, J.; Gattas, C.R. 1982. Immunomodulating substances: an overview. *Rev Microbiol.* 13(2):110-115.
25. Guillier, M., Gottesman, S., and Storz, G. (2006). Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes and Development*, 20(17), 2338-2348.
26. H. Tegel, J. Steen, A. Konrad, H. Nikdin, K. Pettersson, M. Stenvall, S. Tourle, U. Wrethagen, L. Xu, L. Yderland, M. Uhlen, S. Hober, J. Ottosson, (2009) High-throughput protein production – lessons from scaling up from 10 to 288 recombinant proteins per week, *Biotechnol. J.* 4 (1) 51–57.
27. Harmache A, Vitu C, Russo P, Bouyac M, Hielbot C, Peveri P et al. (1995) The Caprine Arthritis Encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. *J Virol.* 69(9):5445-5454
28. Herbert, W.J. (1978) Mineral oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. En: *Handbook of Experimental Immunology*, vol. 3, p.A3.1 (Weir, D.M., Ed.) Oxford, Blackwell Scientific Publications.

29. Hernández Alcántara G., García Torres I., Alba Martínez Z., Ramirez Silva L., (2021) Expresión de proteínas recombinantes en un sistema heterólogo. Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM. *Comité Editorial*: Gonzalez Andrade, M.; Hernandez Alcantara, G.; Martinez Gonzalez, J.J.; Ramirez Silva, L.H. y Vilchis Landeros, M.M. ISSN-0188-137X
30. Hernández R.S.G. (2011). Tesis de Maestría “Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la presencia de artritis – encefalitis caprina en la zona centro del estado de Veracruz”. (Tesis Maestría) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. México, 34-43.
31. INEGI, 2007. Censo agropecuario (2007), México DF.
32. International Classification Taxonomy Viruses (ICTV). (2009) dB Management. 00. 061. 06. Lentivirus. The Universal Virus Database, versión 4. Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
33. Jia B, Jeon CO (2016) High-through put recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol* 6: 160196.
34. Johnson, G.C. et al., (1983). Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Infection and immunity*, 41(2), pp.657–665. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=264693&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
35. Kingsman A, Kim; Kotsopoulou JY, Jara I. Googleapis.com. [citado el 18 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/3e/60/7b/d8c9fe9537f074/ES2618508T3.pdf>
36. Lara, Álvaro R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209-223. Recuperado en 19 de octubre de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006&lng=es&tlng=es.

37. Leginagoikoa de la Arena, I., (2010). *Epidemiología y Diagnóstico de la infección por el Virus Maedi Visna en Diferentes Sistemas de explotación ovinos españoles*. Tesis doctoral, Universidad de Leon.
38. Leroux, C., Cruz, J.C.M. & Mornex, J.-F., (2010). SRLVs: a genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. *Current HIV research*, 8(1), pp.94–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210785>.
39. Liu M, Feng X, Ding Y, Zhao G, Liu H, Xian M (2015) Metabolic engineering of *Escherichia coli* to improve recombinant protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1036710377. doi: 10.1007/s00253-015-6955-9.
40. Lomonte, B. (2007) Manual de Métodos Inmunológicos, 138 pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>
41. Martínez Rodríguez, H.A. et al., (2005). Effect of the caprine arthritis encephalitis virus in the reproductive system of male goats. *Veterinaria Mexico*, 36(2), pp.159–176.
42. Martínez-Navalón B, Peris-Ribera C, Roche Julian ML, Caballer-Galván C. (2001). Efecto del virus de la artritis encefalitis caprina sobre la producción y composición de la leche en cabras murciano-granaditas. Available from: http://www.capraispana.com/enfermedades/cae/efecto_artritis_encefalitis.htm
43. Mary Saltarelli; Gilles Querat; Danielle A.M. Konings; Robert Vigne; Janice E. Clements (1990). *Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus*. 179(1), 347–364. doi:10.1016/0042-6822(90)90303-9
44. Mohamad A. Z, Laurence Dubreil, Gérard Chatagnon, Zakaria Khayli, Marine Theret, Lionel Martignat, Yahia Chebloune and Francis Fieni. (2012). Goat uterine epithelial cells are susceptible to infection with Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) in vivo. *VETERINARY RESEARCH*, 7.
45. Nájera Rivera H. D. (2017) Estandarización, evaluación y validación de la técnica múltiple de luminex para la determinación de artritis encefalitis caprina y partuberculosis caprina. UNAM, FMVZ. Ciudad Universitaria, CDMX.

46. Nájera-Rivera HD, Rodríguez-Cortez AD, Anaya-Santillán MG, Díaz-Aparicio E, Ramos-Rodríguez AV, Siliceo-Cantero IJ, Vázquez-Franco NC, Nieto-Patlán E, De Las Peñas A, Valdés-Vázquez LM, and Cobos-Marín L (2023) Multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against small ruminant lentivirus, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, and *Brucella melitensis* in goats, *Veterinary World*, 16(4): 704–710.
47. Nazara, S. de J. et al., (1985). Estudio Serologico de la Artritis-encefalitis Caprina en México. *Técnica Pecuaria Mexico*, (48), pp.98–101.
48. Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4): p. 593656
49. OIE, (2018). Artritis-Encefalitis caprina y Maedi-visna. In *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. Available from: (https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.07.02_Artritis-Encefalitis_caprina_Maedi_Visna.pdf)
50. Paramio, M.-T. & Izquierdo, D., (2014). Assisted reproduction technologies in goats. *Small Ruminant Research*, 121(1), pp.1-6. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448814000285>.
51. Pasick J. (1998) Use a recombinant maedi-visna virus protein ELISA for the serologic diagnostic of lentivirus infections in small ruminants. *Can. J. Vet. Res.* 62:307-310
52. Peluso, R. & Haase, A., (1985). A Trojan Horse Mechanism for the Spread of Visna Virus in Monocytes. *Virology*, 147, pp.231–236.
53. Perdignes, B. M. (2004). Seguimiento de la infección por el virus de maedi visna en una explotación de ganado ovino. Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense.
54. Perry, L.L. et al., (1995). Depressed CD4+ T lymphocyte proliferative response and enhanced antibody response to viral antigen in chronic lentivirus-induced arthritis. *The Journal of infectious diseases*, 171, pp.328–334. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844368>.
55. Peterhans, E. et al., (1994). Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane proteins associates with the developments of arthritis. *Journal of Virology*, 68, pp.7139–7147.

56. Pétursson, G., Andrés dottir, V., Andrésón, Ó.S., Georgsson, G., Pálsson, P.A., Rafnar, B., Torsteinsdóttir, S. (1992). Lentivirus disease of sheep and goat research. In Speedy, A.W (Oxford), pp. 107-129
57. Phue, J.N., Noronha, S.B., Hattacharyya, R., Wolfe, A.J. y Shiloach, J. (2005). Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: Differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnology and Bioengineering* 90, 805–820.
58. Ramírez A.H. & Martínez R.H.A. (2013). Lentivirus caprinos. En Comité Nacional Sistema Productos Caprinos (Eds.) Tecnologías en apoyo a la caprinocultura. Comité Nacional Sistema Productos Caprinos, 1, (183-195). México, D. F. Comité Nacional Sistema Productos Caprinos.
59. Ramírez A.H., Glaria I., De Andrés X., Martínez H.A., Hernández M.M., Reina R., Iráizoz E., Crespo H., Berriatua V.J., Amorena B. & y De Andrés D. (2011). Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico. *The Veterinary Journal*, 190, 169–172.
60. Ramírez, H. *et al.* (2011) ‘Recombinant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico’, *Veterinary Journal*, 190(1), pp. 169–172. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.09.005.
61. Ramos Rodríguez A. V. (2019). Evaluación de la proteína recombinante GP38 del virus de artritis encefalitis caprina para el desarrollo de una prueba diagnóstica tamiz. UNAM, FMVZ. Ciudad Universitaria, CMDX
62. Rimstad, E. & East, N., (1994). Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Archives of Virology*, 134, pp.345–356.
63. Salinas-Gonzalez, Flores-Nayera MJ, Echavarría- Chairez F, Meza-Herrera, CA, (2013). Investigación participativa y su rol en el desarrollo y la investigación de rumiantes menores en zonas áridas de México. In: La producción de rumiantes menores en las zonas áridas de Latinoamérica. Ed. Luis Iñiguez Rojas. Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA, Brasil), International Fund for

- Agricultural Development (IFAD, Italy), International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA, Jordan). Brasilia, D.F, Brasil. P. 249-278
64. Shah, C., Boni, J., Huder, J.B., Vogt, H.R., Muhlherr, J., Zanoni, R., Miserez, R., Lutz, H., Schupbach, J., (2004) a. 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* 319 (1), 12–26
 65. Sidgursson, B., Grimsson, H, Palsson, P.A. J. (1957). Maedi a chronic progressive infection of sheep lungs. *J. Inf. Dis*, 233 - 241.
 66. Siliceo Cantero I. J. (2014) Evaluación de la proteína p16 del virus de artritis encefalitis caprina para el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta. UNAM. Programa de maestría y doctorado en ciencias de la producción animal. FMVZ, D.F.
 67. Smith, M. C. and Sherman, D. M. (2009) *Goat Medicine, Goat Medicine: Second Edition*. doi: 10.1002/9780813818825.
 68. Stonos, N. *et al.* (2013) ‘Seroprevalence of small ruminant lentivirus infection in Ontario goat herds’, *Small Ruminant Research*, 114(2–3), pp. 284–288. doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.06.016.
 69. The center for food security & public healthsity, O., (2007). Artritis y encefalitis caprina. *Iowa State University*, (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/artritis-encefalitis-caprina.pdf>), pp.1–5.
 70. Thulasingam, M. *et al.* (2017) ‘Characterization of Salmonella typhi OmpC and OmpF porins engineered with HIV-gp41 epitope on the surface loops’, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. doi: 10.1002/prot.25246.
 71. Tian W., Wang L., Lei H., Sun Y., Xao Z., (2018). Antibody production and application for immunoassay development of enviariomental hormones: a review, *Chemical and biological technologies in agriculture*, 5:5.
 72. Torres-Acosta J.F.J., Gutierrez-Ruiz E.J., Butler V., Schmidt A., Evans J., Babington J., Bearman K., Fordham T., Brownlie T., Schroer S., Cámara G.E. &, and Lightsey J. (2003). Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. *Small Ruminant Research*, 49 (2), 207-211.

73. Toussi, D. N., Liu, X. and Massari, P. (2012) 'The FomA porin from *Fusobacterium nucleatum* is a toll-like receptor 2 agonist with immune adjuvant activity', *Clinical and Vaccine Immunology*. doi: 10.1128/CVI.00236-12.
74. Trigo Tavera, F. J. (1991) 'La Artritis encefalitis caprina', *Ciencia Veterinaria*.
75. Tu, P., Shiau, J., Lai, F., Yang, S., & Wang, P. (2017). Diagnostic tests for caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *Journal of Rare Diseases Research and Treatment*, 2(5), 13-17
76. Vázquez Franco, N.C. & Ducoing Watty, A.E., (2011). *Identificación de Lentivirus de Pequeños Rumiantes genotipo B1 y desarrollo de herramientas moleculares para su diagnóstico*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
77. Wetzler, L. M. (2010) 'Innate immune function of the neisserial porins and the relationship to vaccine adjuvant activity', *Future Microbiology*. doi: 10.2217/fmb.10.41.
78. Workman A., Aaron M. Dickey, Michael P. Heaton, Michael L. Clawson, Timothy P. L. Smith. (2017). Complete Genome Sequences of Two Genotype A2 Small Ruminant Lentiviruses Isolated from Infected U.S. Sheep. *American Society for microbiology*, 5, 2.
79. Wu, JW & Filutowicz, Marcin. (1999). Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: A cautionary tale. *Acta biochimica Polonica*. 46. 591-9. doi: 10.18388/abp.1999_4131.