



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Identificación de Lentivirus de Pequeños Rumiantes  
genotipo B1 y desarrollo de herramientas  
moleculares para su diagnóstico.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**NORMA CONCEPCIÓN VÁZQUEZ FRANCO**

Tutor Principal:  
Dr. Andrés Ernesto Ducoing Watty  
Tutor Principal Externo;  
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava  
Comité Tutorial:  
Dra. Laura Cobos Marín



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.

## CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue elaborada en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, y en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Andrés Ernesto Ducoing Watty y el Dr. Alejandro De Las Peñas Nava, con apoyo del proyecto PAPIIT IN211310 de la UNAM. Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica, con número de registro 225311, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la UNAM por ser esa fuente inagotable de conocimiento,  
A mi Facultad por darme tantas oportunidades,  
Al DMyZR por ayudarme en mi formación,  
Al IPICYT por todas las lecciones,  
Al Dr. Andrés Ducoing por su paciencia,  
Al Dr. Alejandro De Las Peñas Nava por sus enseñanzas,  
A la Dra. Laura Cobos por su orientación,  
A mis amigos por enseñarme tantas cosas nuevas,  
Sin todos ustedes esto no sería posible.**

## **DEDICATORIA**

**A ti por cuidarme desde el cielo...**

**A ustedes dos por todas las cosas que me han dado...**

**Y a ti por creer en mí a pesar de todo y seguir aquí después de  
todo...**

**Los amo.**

## ÍNDICE

	Página
<b>CRÉDITOS INSTITUCIONALES</b>	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	III
<b>DEDICATORIA</b>	IV
<b>ÍNDICE</b>	V
<b>LISTA DE CUADROS</b>	VII
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	VIII
<b>ABREVIATURAS Y SIGLAS</b>	X
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>REVISIÓN DE LA LITERATURA</b>	4
Justificación	13
Objetivos	13
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	14
<b>1. Análisis bioinformático y filogenético del LVPR.</b>	14
<b>2. Determinación del genotipo y subtipo de LVPR mediante PCR.</b>	15
Diseño de oligonucleótidos para la identificación del genotipo y subtipo de LVPR.	15
Análisis de los oligonucleótidos que identifican el genotipo y subtipo de LVPR.	15
PCR control estandarizado.	23
Muestras clínicas.	23
PCR de muestras clínicas.	24
<b>3. Amplificación de secuencias que codifican proteínas estructurales de LVPR B1.</b>	25
Diseño de oligonucleótidos.	25
Amplificación de secuencias.	28
<b>4. Transformación de <i>E. coli</i> BL21–Codon Plus (DE3)–RIL®.</b>	29
Clonación de los fragmentos p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM en pMB11.	29

	<b>Página</b>
Transformación de <i>E. coli</i> DH10 con pMB11/MA, pMB11/CA, pMB11/NC y pMB11/TM.	30
Subclonación de los fragmentos en pET24.	32
Transformación de <i>E. coli</i> DH10 con las reacciones de ligación con pET24.	35
Transformación de <i>E. coli</i> BL21–Codon Plus (DE3)–RIL© con pVF9, pVF12, pVF13 y pVF16.	38
<b>5. Inducción de sobreexpresión de proteínas virales.</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>1. Análisis bioinformático y filogenético del LVPR.</b>	<b>40</b>
<b>2. Diseño de oligonucleótidos.</b>	<b>40</b>
<b>3. Determinación del genotipo y subtipo de LVPR mediante PCR.</b>	<b>46</b>
<b>4. Inducción de sobreexpresión de proteínas virales.</b>	<b>49</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>PROSPECTIVA</b>	<b>53</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO 1. MEDIOS Y SOLUCIONES</b>	<b>60</b>

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
1. Principales funciones del genoma viral y proteínas codificadas	6
2. Pruebas diagnósticas para detección de LVPR	10
3. Características de las cepas 1 a 8 obtenidas por electroporación	32
4. Características de las cepas 9 a 16 obtenidas por electroporación	37
5. Características de las cepas 17 a 26 obtenidas por TSS y choque térmico	38
6. Características de los oligonucleótidos diseñados para la detección de genotipo de LVPR	43
7. Características de los oligonucleótidos diseñados orientados a la sobreexpresión de proteínas de LVPR B1	44
8. Longitud esperada de los fragmentos obtenidos con los pares de oligonucleótidos orientados al LVPR B1	48

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. Estructura del LVPR.	5
2. Organización del genoma viral del LVPR.	5
3. Ciclo de replicación viral.	8
4. Alineamiento de las secuencias de LVPR B1 y LVPR B2.	16
5. Alineamiento de las secuencias de LVPR E.	17
6. Alineamiento de las secuencias de LVPR A1 y LVPR A2.	18
7. Alineamiento de todas las secuencias obtenidas en el NCBI.	20
8. Alineamiento de las secuencias de LVPR A1 y LVPR A2 para el diseño de los oligonucleótidos orientados a la detección de LVPR A1 ó A2.	21
9. Alineamiento de las secuencias de LVPR B1 y LVPR B2 para el diseño de los oligonucleótidos orientados a la detección de LVPR B1 ó B2.	22
10. Reacción de PCR con el juego de los oligonucleótidos CA1/CA3 y el plásmido pCAEVneo11 como molde.	23
11. Detección de polimorfismos del gen de la caseína $\alpha$ 1 de caprinos.	24
12. Diseño de los oligonucleótidos #27 y #28 en el mapa de traducción de la secuencia M33677 (LVPR B1).	25
13. Diseño de los oligonucleótidos #29 y #30 en el mapa de traducción de la secuencia M33677 (LVPR B1).	26
14. Diseño de los oligonucleótidos #31 y #32 en el mapa de traducción de la secuencia M33677 (LVPR B1).	26
15. Diseño de los oligonucleótidos #33 y #34 en el mapa de traducción de la secuencia M33677 (LVPR B1).	27
16. Localización de los oligonucleótidos para amplificar las secuencias que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM de LVPR B1.	27
17. Reacción de PCR para la amplificación de productos que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM.	28
18. Mapa gráfico del plásmido pMB11.	29
19. Digestión del plásmido pMB11.	30

	<b>Página</b>
20. PCR de 40 colonias de <i>E. coli</i> DH10, para detectar las clonas positivas para las secuencias que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM.	31
21. Digestiones completas de los plásmidos pVF1 a pVF6 ( <i>Bam</i> H I- <i>Xho</i> I) y pVF7, pVF8 ( <i>Bam</i> H I- <i>Sac</i> I).	33
22. Purificaciones de gel de los fragmentos digeridos p16-MA, p28-CA, p14-NC ( <i>Bam</i> H I- <i>Xho</i> I) y gp38-TM ( <i>Bam</i> H I- <i>Sac</i> I), pET24/ <i>Bam</i> H I- <i>Xho</i> I y pET24/ <i>Bam</i> H I- <i>Sac</i> I.	33
23. Mapa gráfico del plásmido pET24.	34
24. Sitio de clonación múltiple del plásmido pET24.	35
25. Digestiones del plásmido pET24 con las enzimas de restricción <i>Bam</i> H I/ <i>Xho</i> I y <i>Bam</i> H I/ <i>Sac</i> I.	35
26. PCR de 40 colonias de <i>E. coli</i> DH10, para detectar las clonas positivas para las secuencias que codifican la proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM.	36
27. Digestiones completas de los plásmidos pVF9 a pVF14 ( <i>Bam</i> H I- <i>Xho</i> I) y pVF15, pVF16 ( <i>Bam</i> H I- <i>Sac</i> I).	37
28. Árbol filogenético de todas las secuencias de genoma completo de LVPR A.	41
29. Árbol filogenético de todas las secuencias de genoma completo de LVPR B.	42
30. Reacción de PCR control con un solo oligonucleótido (análisis “single primer”).	45
31. Reacción de PCR control para cada par establecido de oligonucleótidos, con el plásmido pCAEvneo11.	46
32. Reacción de PCR diagnóstico.	47
33. Localización de los oligonucleótidos diseñados orientados a la detección del LVPR B1 en el mapa genómico parcial para dicho tipo viral.	48
34. Reacción de PCR orientada a la detección del LVPR B1.	49
35. Electroforesis de extractos totales de proteínas de las cepas transformadas de <i>E. coli</i> BL21–Codon Plus (DE3)–RIL© antes y después de su inducción con IPTG, bajo condiciones desnaturalizantes de SDS-PAGE 12%.	50

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>A</b> - Adenina	Information
<b>ADN</b> - Ácido desoxirribonucleico	<b>O.D.</b> - Densidad óptica
<b>ADNc</b> - ADN copia	<b>OIE</b> - Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>AEC</b> - Artritis Encefalitis Caprina	<b>pb</b> - pares de bases
<b>ARN</b> - Ácido ribonucleico	<b>PCR</b> - Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ARNm</b> - ARN mensajero	<b>PMBC</b> - Células mononucleares de sangre periférica
<b>ASB</b> - Albumina sérica bovina	<b>Sac5%</b> - Sacarosa 5%
<b>C</b> - Citosina	<b>SDS-PAGE</b> - Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>CA</b> - Cápside	<b>SENASICA</b> - Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria
<b>Cm</b> - Cloramfenicol	<b>SU</b> - Subunidades proteínicas de superficie
<b>ELISA</b> - Ensayo inmunoenzimático	<b>T</b> - Timina
<b>G</b> - Guanina	<b>TM</b> - Proteína Transmembranal
<b>ID</b> - Inmunodifusión en gel agar	<b>TR</b> - Transcriptasa reversa
<b>IN</b> - Integrasa	<b>TSS</b> - Solución de transformación y reserva
<b>IPTG</b> - Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido	
<b>Km</b> - Kanamicina	
<b>LB</b> - Medio de cultivo Luria-Bertani	
<b>LTR</b> - Repeticiones terminales largas	
<b>LVPR</b> - Lentivirus de Pequeños Rumiantes	
<b>MA</b> - Matriz	
<b>NC</b> - Nucleocápside	
<b>NCBI</b> - National Center for Biotechnology	

## RESUMEN

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) causada por Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) es una enfermedad con un elevado impacto económico sobre el ganado caprino en sistemas intensivos de producción lechera. Debido a esto y para evitar la diseminación de la AEC, es necesario que los programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad estén basados en métodos de diagnóstico específicos, rápidos y oportunos capaces de detectar animales portadores en etapas tempranas de la infección, contemplando el tipo viral presente en nuestro país y las características epidemiológicas inherentes a ésta. En este trabajo se realizó un análisis filogenético y bioinformático de LPVR y se diseñaron oligonucleótidos con los que se analizó e identificó mediante PCR el genotipo y subtipo viral en un grupo de caprinos de la FMVZ-UNAM. Los resultados obtenidos con el PCR diagnóstico orientaron el trabajo hacia la detección de LVPR genotipo B1 y hacia el diseño y construcción de herramientas moleculares para la sobreexpresión de proteínas recombinantes codificadas en este genotipo. Esta información se usará como base para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico de serológico. Los resultados podrían ser de gran utilidad para la detección del LVPR genotipo B1 en las granjas particulares de producción lechera intensiva del país y confirmar con esto el genotipo de LVPR presente en México. La sobreexpresión de proteínas recombinantes virales y el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico serológicas servirían para desarrollar una prueba de campo, con la que se obtendrían resultados inmediatos que repercutirán en las decisiones diarias sobre el manejo de los animales dentro de los programas de control de LVPR.

## **ABSTRACT**

Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE) caused by Small Ruminant Lentivirus (SRLV) is considered of high economic impact on the intensive dairy goat production systems. It is important for disease prevention, control and eradication to have specific and opportune diagnostic methods that can detect the infection at early stages. For the diagnostic methods it is important to consider the type of strain virus present in our country along with the epidemiological data for the particular strain. In this work, a phylogenetic and bioinformatic analysis of SRLV was performed and viral genotype and subtype were analyzed and identified by PCR analysis with goat DNA samples from a collection from the School of Veterinary Sciences of the National University of Mexico (FMVZ-UNAM). The PCR analysis for the detection of SRLV B1 prompted us to design expression vectors to overexpress recombinant proteins from this genotype. These data will be used for the development of a serologic diagnostic tool. Design of vectors is important for the detection of SRLV genotype B1 in goat dairy farms and furthermore, to confirm the presence of the SRLV genotype in Mexico. The purified recombinant viral proteins and the new developed serologic diagnostic tool would be used to develop a field test, for immediate results that would assist the everyday decisions about the management of animals within SRLV control programs.

## INTRODUCCIÓN

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) causada por Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) es una enfermedad con un elevado impacto económico sobre el ganado caprino en sistemas intensivos de producción lechera (Peterhans *et al*, 2004; Cunha *et al*, 2001; Rowe & East, 1997; Greenwood, 1995). El impacto económico está determinado directamente por la tasa de infección del rebaño, la proporción de animales con signos clínicos y la edad de éstos (Rowe & East, 1997). Las características de la enfermedad dificultan la producción de vacunas, haciendo necesario que los programas de control y erradicación estén basados en métodos de diagnóstico específicos, rápidos y oportunos (Lara *et al*, 2002).

El diagnóstico serológico es el más práctico para los LVPR. De este modo, la prevalencia real está determinada por los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba utilizada, lo que involucra las características del antígeno empleado en su fabricación (Özyörük *et al*, 2001). Como complemento, se recomienda determinar la presencia del virus con PCR ó Aislamiento viral (De Andrés *et al*, 2005) ya que el diagnóstico serológico se complica por las variaciones genéticas del virus, la evolución lenta de la enfermedad, el tiempo de seroconversión y la producción de anticuerpos dirigidos hacia proteínas no consideradas inmunodominantes (Martínez *et al*, 2005; Blacklaws *et al*, 2004; Nord *et al*, 1998). Estas circunstancias, sumadas a las prácticas de manejo en México, repercuten de manera importante en la diseminación de la enfermedad en los rebaños y dificultan la aplicación de los programas de prevención, control y erradicación de los LVPR.

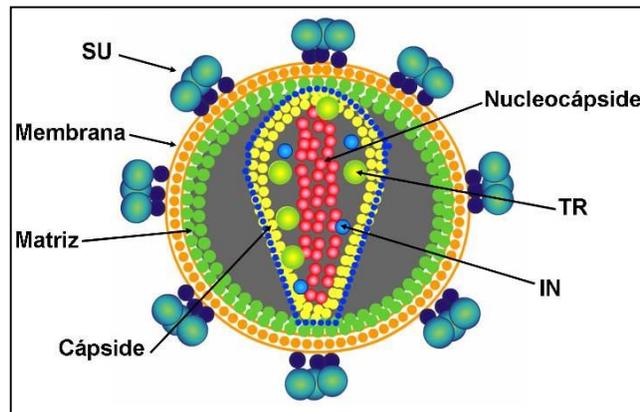
Para evitar la diseminación de la enfermedad dentro y fuera del rebaño, es necesario desarrollar técnicas de diagnóstico capaces de detectar animales en etapas tempranas de la infección, donde se contemple siempre el tipo viral presente en nuestro país y las características epidemiológicas inherentes a éste. En este trabajo se realizó un análisis bioinformático de LVPR y se identificó mediante técnicas moleculares el LVPR genotipo B subtipo 1 en un grupo de caprinos de la FMVZ-UNAM. Se propone que los resultados se utilicen como base para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico serológico y a su vez para una prueba diagnóstica de campo que pueda ser usada por personas con una capacitación básica y sencilla.

## REVISIÓN DE LA LITERATURA

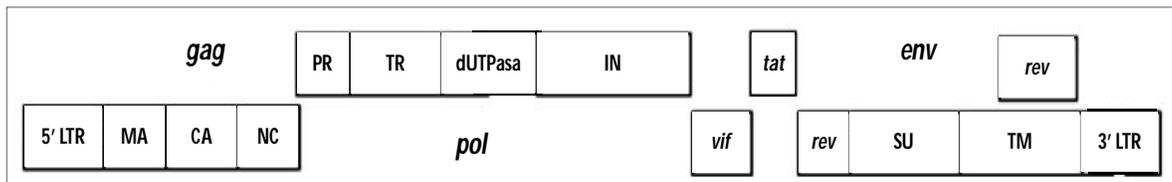
La Artritis-Encefalitis Caprina (AEC) es una enfermedad causada por un Retrovirus Lentivirus, el cual produce patologías específicas mediadas por el sistema inmune (Rauddi, 2005). El virus se clasifica como Retrovirus ya que su genoma está codificado en una molécula de ARN y para su replicación utiliza la enzima transcriptasa reversa (TR), y como Lentivirus porque causa enfermedades crónico-degenerativas y una infección persistente (Rauddi, 2005; Blacklaws, 2004). La descripción de secuencias (parciales o completas) del genoma viral de aislados clínicos de rebaños caprinos y ovinos ha derivado en el uso de los términos Virus de Artritis-Encefalitis Caprina ó Lentivirus Caprino y Neumonía Progresiva Ovina, Virus de Maedi-Visna ó Lentivirus Ovino. Sin embargo, los estudios filogenéticos de varias regiones geográficas, los reportes de recombinación genética entre los virus y sobre la infección cruzada entre ovinos y caprinos de manera natural, han determinado que recientemente el virus de AEC se considere junto con el Virus de Maedi-Visna como un mismo virus, el Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) (Pisoni *et al*, 2007; Pisoni *et al*, 2005; Shah *et al*, 2004a; Shah *et al*, 2004b; Castro *et al*, 1999.).

Actualmente, dentro de la clasificación filogenética de los LVPR existen 5 genotipos que van del A al E. El genotipo A se considera como “virus tipo Maedi-Visna” (Maedi-Visna-liked viruses), se ha identificado a partir de muestras de ovinos y se divide en 7 subtipos (1 a 7); de éstos los subtipos 1, 3, 4, y 6 se han identificado también en caprinos. El genotipo B incluye los “virus tipo AEC” (Caprine Arthritis-Encephalitis Virus-like viruses), aislados principalmente de cabras y con sólo los subtipos 1 y 2, sin embargo se ha observado que ambos presentan infección cruzada con los ovinos. Los genotipos C y D han sido aislados de ovinos y caprinos de Europa y el genotipo E, sólo ha sido descrito en caprinos de Italia. (Glaria *et al*, 2009; Kaba *et al*, 2009; Kuzmak *et al*, 2007; Blacklaws *et al*, 2004; Shah *et al*, 2004a; Shah *et al*, 2004b; Castro *et al*, 1999; Test *et al*, 1999; Pasick, 1998). La clasificación filogenética de los LVPR se basa principalmente en el uso de las secuencias del gen *pol* y las regiones genéticas terminales largas (LTR por sus siglas en inglés) (Glaria *et al*, 2009; Shah *et al*, 2004a; Shah *et al*, 2004b). La homología de los genomas que existe entre los LVPR determina características comunes como: la morfología, el tropismo por células del sistema fagocítico-mononuclear, el mecanismo de replicación, las características epidemiológicas y antigénicas y la infección cruzada entre ovinos y caprinos de los tipos ya mencionadas (Lima *et al*, 2004; Shah *et al*, 2004a; Shah *et al*, 2004b; Cunha *et al*, 2001; Test *et al*, 1999).

El LVPR posee una envoltura lipídica cubierta de ácido siálico donde se encuentran ancladas proteínas de superficie (gp135-SU). Hacia el interior de la envoltura, se encuentra la matriz (p16-MA) que es un dominio proteínico que rodea al conjunto central cápside, nucleocápside y genoma de ARN (p28-CA - p14-NC - ARN) y las enzimas transcriptasa reversa (TR) e integrasa (IN) (Figura 1). El LVPR tiene un genoma de ARN de doble cadena, donde se encuentran los genes poliproteínicos *gag*, *pol* y *env* que codifican proteínas estructurales y enzimas virales; y los genes accesorios *tat*, *vif* y *rev*, que codifican proteínas que participan en el ciclo de replicación, la patogénesis y la virulencia específicas de cada genotipo de LVPR (Figura 2, Cuadro 1) (Raudí, 2005; Cunha *et al*, 2001; Castro *et al*, 1999; Rowe & East, 1997).



**Figura 1.** Estructura del LVPR. SU: Proteínas superficiales de la envoltura; TR: Transcriptasa reversa; IN: Integrasa. Tomado de Raudí, 2005; modificado por Norma Vázquez.



**Figura 2.** Organización general del genoma de LVPR. Tomado de Reina *et al*, 2009a, modificado por Norma Vázquez. *gag*, *pol* y *env*: genes principales; *vif*, *tat* y *rev*: genes accesorios; LTR: repeticiones terminales largas; MA: secuencia para la proteína MA; CA: secuencia para la proteína CA; NC: secuencia para la proteína NC; PR: secuencia para la proteína PR; TR: secuencia para la proteína TR; dUTPasa: secuencia para la proteína dUTPasa; IN: secuencia para la proteína IN; SU: secuencia para la proteína SU; TM: secuencia para la proteína TM.

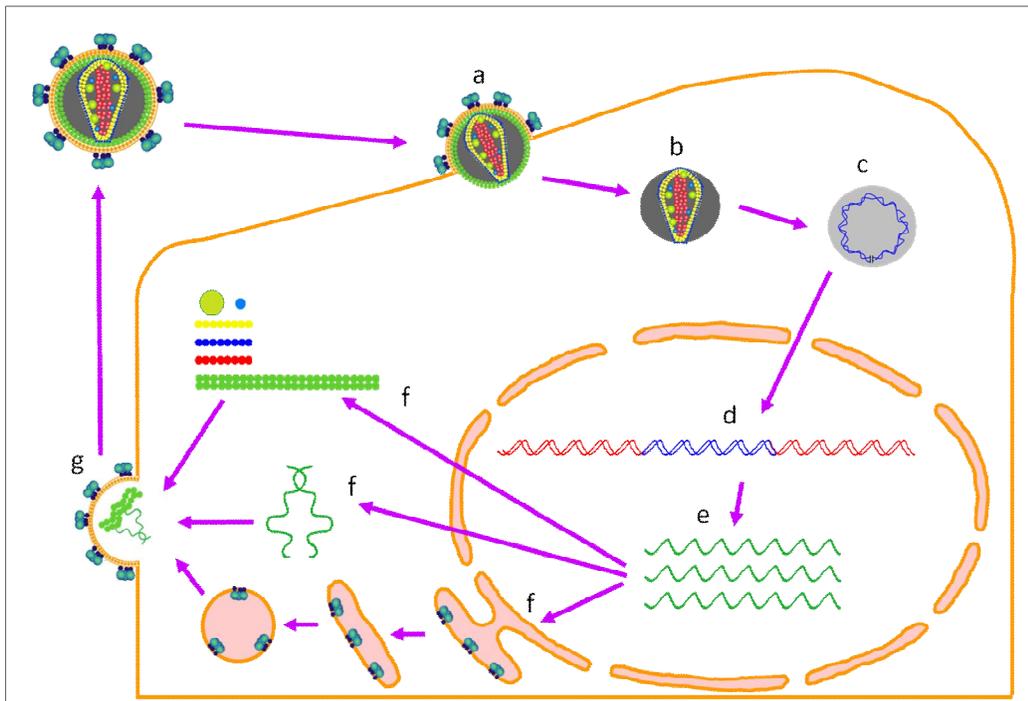
Cuadro 1

**PRINCIPALES FUNCIONES DEL GENOMA VIRAL  
Y PROTEÍNAS CODIFICADAS\***

GEN	FUNCIONES	PROTEÍNA CODIFICADA	CARACTERÍSTICAS
<i>gag</i>	Codifica para proteínas estructurales. Dirige el ensamblado de las partículas virales	Matriz p16-MA	Principal componente proteínico en la partícula viral madura.
		Cápside p28-CA	Forma parte del conjunto central CA-NC-ARN
		Nucleocápside p14-NC	Forma parte del conjunto central CA-NC-ARN
<i>pol</i>	Codifica para las enzimas virales utilizadas en el ciclo de replicación viral	Proteasa PR	Responsable de que las partículas virales adquieran la morfología madura del género retroviral
		Retrotranscriptasa TR	Sintetiza el ADN copia (ADNc) a partir del ARN viral
		dUTPasa DU	Indispensable para la replicación viral. Asociada al grado de patogenicidad viral.
		Integrasa IN	Media la integración del ADNc al genoma de la célula hospedadora
<i>env</i>	Codifica para proteínas de la envoltura (espículas glicoproteínicas de la superficie)	Unidades de superficie gp135-SU	Se une a receptores celulares específicos determinando el tropismo del virus
		Transmembranasa gp38-TM	Media la fusión de la membrana viral con la celular y permite el ingreso del virus a la célula
<i>tat</i>	Activador de la transcripción viral	Tat	Activa la transcripción viral y la expresión de genes celulares implicados en la vía de activación
<i>vif</i>	Factor de infectividad del virión	Vif	Formación y liberación de los nuevos virus producidos después del ciclo de replicación
<i>rev</i>	Traducción de ARN	Rev	Facilita la exportación ARNm a citoplasma

\* Reina *et al* 2009a; Rauddi, 2005; Cunha *et al*, 2001; Castro *et al*, 1999; Pasick, 1998; Harmache *et al*, 1995a; Harmache *et al*, 1995b.

Una vez en el hospedero, el ciclo de replicación del virus comienza cuando se une mediante las proteínas de superficie (SU) a un receptor de la célula blanco (células del sistema fagocítico-mononuclear) (Rauddi, 2005; Cunha *et al*, 2001). No se conocen los receptores específicos de los LVPR, sin embargo, Crane *et al* (1991) identificaron receptores de membrana con un peso aproximado de 15kD, 20kD y 30kD y Crespo *et al* (2011) establecen la participación de los receptores de mananas en el proceso de infección con LVPR. La unión entre el virus y su receptor activa la fusión de las membranas viral y celular (Figura 3.a), y permite la entrada del conjunto central CA-NC-ARN a la célula (Figura 3.b). Una vez dentro de la célula se activa la Transcriptasa reversa (TR) que utiliza genoma de ARN del virus como molde para sintetizar una copia de ADN (ADNc) (Figura 3.c). La transcripción reversa del genoma del virus genera en los extremos del ADNc, regiones no codificantes llamadas repeticiones terminales largas (LTR por sus siglas en inglés). Estas secuencias son necesarias para la integración del genoma viral en el genoma celular, y también indican el sitio de inicio y término de la transcripción. El ADNc se importa al núcleo a través de un mecanismo de transporte que requiere energía. Una vez dentro del núcleo, la enzima IN cataliza la integración estable del ADNc al genoma de la célula infectada; al genoma viral integrado en el genoma de la célula se le conoce como provirus (Figura 3.d). El provirus permanece latente hasta que el monocito madura como macrófago, en este momento se empiezan a transcribir los genes codificados en el genoma viral (Figura 3.e). Los ARN mensajeros (ARNm) son traducidos a proteínas (Figura 3.f), que son ensambladas junto con ARN genómico para formar la estructura viral. Estas estructuras son liberadas por gemación a través de la membrana plasmática (Figura 3.g) sin producir lisis celular (virus no citocida). Este modo de replicación del virus asegura la continuidad de la infección. En algunas ocasiones, la acumulación excesiva del complejo proteínico Gag en la membrana plasmática de la célula infectada produce viriones inmaduros que se procesan mediante la proteasa viral (PR), la cual induce la reorganización interna de la estructura viral (maduración) (Rauddi, 2005; Cunha *et al*, 2001).



**Figura 3.** Ciclo de replicación viral. a. Unión a receptores de membrana y fusión con la membrana de la célula huésped. b. Entrada del complejo CA-NC-ARN. c. Síntesis del ADNc. d. Integración al ADN de la célula huésped. e. Activación de la transcripción. f. Activación de la traducción. g. Ensamblaje de las partículas virales junto ARN genómico y liberación por gemación de un nuevo virión.

El LVPR genotipo B (causante de AEC) infecta animales de ambos sexos y de cualquier raza o edad; aunque se ha reportado una mayor prevalencia en las razas lecheras y en animales mayores a 5 años. Se observan cuatro cuadros clínicos importantes que son: artritis, mastitis indurativa, neumonía crónica y parálisis progresiva de tipo nervioso. (Lara *et al*, 2005; Nord *et al*, 1998; Rowe & East, 1997). La enfermedad puede llegar a tener una importante repercusión económica (Peterhans *et al*, 2004; Cunha *et al*, 2001; Greenwood, 1995), la cual estará determinada directamente por la tasa de infección del rebaño y la edad de los animales con signos clínicos (Rowe & East, 1997).

Las repercusiones económicas de la enfermedad pueden darse por: muerte de animales jóvenes, bajo peso al nacimiento, retardo en el crecimiento y en la ganancia de peso, predisposición a infecciones secundarias, gastos por programas de control y por manutención de

animales enfermos, disminución de la producción y calidad de la leche, disminución de la vida productiva, bajo aprovechamiento genético y desvalorización comercial de los caprinos y de sus productos (principalmente semen y embriones) (Peterhans *et al*, 2004; Cunha *et al*, 2001; Martínez-Navalón *et al*, 2001; Greenwood, 1995). Mientras más alta sea la tasa de infección de la enfermedad en el rebaño, mayor será el impacto económico (Peterhans *et al*, 2004; Rowe & East, 1997).

En México, la AEC está clasificada como una Enfermedad Enzootica de Reporte Obligatorio Mensual, “... *que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional*”, con base en la NOM-046-ZOO-1995 y el Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 7 de enero de 2009 (SAGARPA, 2011a; SAGARPA, 2011b). Por esto, desde 1996, el gobierno regula la importación de animales y permite únicamente la introducción de aquéllos con resultado seronegativo a AEC o que provengan de un rebaño con certificado de “Libre de la Enfermedad” (Torres-Acosta *et al*, 2003; Cuéllar-Ordaz, 2002). La presencia de la enfermedad en algunos rebaños orientados a la producción lechera está sustentada con estudios recientes de seroprevalencia realizados en el país (Vázquez-Franco, 2008; IPICYT, 2003; Tesoro *et al*, 2003; Torres-Acosta *et al*, 2003; Reséndiz-Martínez *et al*, 2002); sin embargo, el reporte de la enfermedad ante la autoridad correspondiente ha sido casi nulo (Tesoro *et al*, 2003; Leyva *et al*, 1998), como se observa en la base de datos del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), donde sólo se mencionan 37 casos comprendidos en los años 1997, 1999 y 2002 (OIE, 2011a; OIE, 2011b; SAGARPA, 2011c).

Las características epidemiológicas, patogénicas y antigénicas de la AEC (LVPR B) sumadas a las prácticas de manejo en el país; repercuten de manera importante en la diseminación de la enfermedad en los rebaños y dificultan la aplicación de los programas de prevención, control y erradicación de la AEC. Dentro del país estas prácticas de manejo incluyen: el uso de programas de desarrollo rural basados en el mejoramiento genético a través de la importación de animales provenientes de países que presentan la enfermedad, la práctica de tránsito interestatal que incluye venta, préstamo e intercambio de caprinos, semen y embriones entre las granjas del país, la manutención de los animales infectados dentro de la misma área de aquellos no infectados, el uso de lactancia natural en las hembras infectadas, el uso de “línea de ordeño” continua entre hembras infectadas y no infectadas y el uso compartido de material y equipo (jeringa, tatuadores, equipo de limpieza) entre animales infectados y no infectados (Cunha *et al*, 2001; Rowe & East, 1997; East *et al*, 1993). Todo esto, favorece la diseminación de AEC dentro del territorio mexicano

(Martínez *et al*, 2005; IPICYT, 2003; Torres-Acosta *et al*, 2003); factores que afectan la distribución y el impacto de la enfermedad sobre el ganado mestizo, esta situación se desconoce ya que el ganado mestizo recibe poca atención sanitaria en nuestro país (Leyva *et al*, 1998).

La complejidad de la enfermedad y su elevado impacto económico sobre el ganado caprino en sistemas intensivos de producción lechera (Peterhans *et al*, 2004; Rowe & East, 1997) hace impostergable y necesario el desarrollo de programas para la prevención, control y erradicación de la AEC basados en métodos de diagnóstico específicos, rápidos y oportunos es (Lara *et al*, 2002).

En general, el diagnóstico se complica por las variaciones genéticas y la latencia del virus, la evolución lenta de la enfermedad y el tiempo de exposición de los animales al agente. Estos factores tienen un impacto importante en el tiempo de seroconversión de los animales, que puede ocurrir en un lapso de las 2 semanas ó hasta 2 años post-infección (Blacklaws *et al*, 2004; Nord *et al*, 1998). Es por esta razón que algunos autores recomiendan complementar el diagnóstico a través de alguna técnica directa que determine la presencia del virus (Martínez *et al*, 2005; Test *et al*, 1999). (Cuadro 2).

**Cuadro 2**

**PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA DETECCIÓN DE LVPR\***

	Técnicas Directas	Técnicas Indirectas
Detección	Virus libre, ARN o ADN proviral	Anticuerpos contra el virus AEC
Muestras utilizadas	Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y tejidos, secreciones corporales con células epiteliales y células mononucleares.	Suero, semen y leche o calostro
Pruebas**	PCR, Aislamiento viral con formación de sincitios como efecto citopático característico.	ELISA, ID, IFI, WB
Ventajas	Determinación de animales infectados aún en ausencia de anticuerpos y signos clínicos.	Practicidad en la colecta de las muestras.

\* Martínez *et al*, 2005; Herrmann *et al*, 2003; Lara *et al*, 2002; Rowe & East, 1997; Reddy *et al*, 1993.

\*\* PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; ID: Inmunodifusión en gel agar; ELISA: Ensayo inmunoenzimático, IFI: Inmunofluorescencia indirecta; WB: Western blot.

Dentro de las técnicas de diagnóstico directas, el método de PCR se ha utilizado para detectar LVPR en muestras de sangre y otros tejidos como semen, leche y líquido sinovial de animales en etapas tempranas de la infección. El objetivo de esta prueba es evitar falsos negativos/positivos causados ya sea por una seroconversión tardía o por la detección de anticuerpos maternos calostrales (Reddy *et al*, 1993). No obstante, la prueba de PCR tiene dos problemas importantes, una es la variación genética de los tipos virales (mutaciones debidas a la TR) y la carga viral *in vivo*. Para el primer caso, se ha utilizado todo el genoma del virus (incluyendo las regiones LTR del ADN proviral) para diseñar los oligonucleótidos de las pruebas de PCR. El diseño de oligonucleótidos se dirige primordialmente hacia regiones conservadas dentro del genoma de LVPR: *pol*, LTR, *gag* (en orden descendente) (De Andrés *et al*, 2005; Rauddi, 2005). Sin embargo, Travassos, *et al* (1999), encontró que el diagnóstico por PCR basado en oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia del gen *env* puede ser eficiente en la detección de animales infectados sin importar la alta variación reportada para dicha región. En cuanto a la carga viral *in vivo*, se prefieren las muestras de células mononucleares de sangre periférica (PMBC) dada la facilidad para obtenerlas. Sin embargo, se pueden obtener resultados falsos negativos ya que la carga viral en estas células puede estar por debajo del límite de detección del ensayo ( $1/10^5$  a  $1/10^6$  monocitos contienen el virus) (De Andrés *et al*, 2005). El PCR es de gran utilidad en la detección de animales infectados en etapas previas a la seroconversión y se prefiere a las técnicas de diagnóstico serológicas; sin embargo, De Andrés *et al* (2005) y Zanoni *et al* (1992) indican que es necesario utilizar técnicas directas e indirectas para confirmar el diagnóstico de LVPR.

El diagnóstico de LVPR más práctico es mediante la detección de anticuerpos en suero (técnicas indirectas). Las técnicas diagnósticas indirectas usadas como métodos de rutina son la inmunodifusión en gel agar (ID) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Debido a su fácil manejo y bajo costo, ambas pruebas son recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para el diagnóstico durante la comercialización internacional de animales (OIE, 2004). Mediante estas técnicas, la prevalencia real de la enfermedad está determinada por los valores de sensibilidad y especificidad inherentes de la prueba diagnóstica utilizada; valores que son resultado del antígeno ocupado en ella: virus completo, proteínas recombinantes ó péptidos sintéticos (De Andrés *et al*, 2005; Knowles *et al*, 1994). De Andrés *et al* (2005) indican que el uso de antígenos relacionados con la envoltura y el conjunto central (proteínas recombinantes ó péptidos sintéticos), dan resultados similares de sensibilidad y especificidad a las pruebas en las que se utiliza el virus completo. La producción de anticuerpos contra el LVPR B (AEC) va dirigida principalmente contra la proteína externa gp135-SU y contra la proteína p28-CA, ambas inmunodominantes. Existe también una producción importante de anticuerpos contra p14-NC. Las pruebas serológicas se basan esencialmente en la presencia de gp135-SU ya que esta proteína se considera la más

inmunodominante, por interactuar con los receptores de las células blanco y presentar reacción cruzada con el LVPR subtipo A (Maedi-Visna) (Özyörük *et al*, 2001). Sin embargo, la variación genética entre los LVPR, la expresión de proteínas no inmunodominantes (p16-MA, gp38-TM, p45-46, p55, p70, p90-92, p170) y la seroconversión de los animales hacia dichas proteínas, pueden ocasionar que las pruebas diagnósticas que utilizan antígenos inmunodominantes no detecten anticuerpos contra LVPR en los animales infectados (Reina *et al*, 2009b; Pérez, 2005; Clavijo & Thorsen, 1995; Rimstad *et al*, 1994).

El diagnóstico serológico de los rebaños infectados con LVPR se ve afectado por las características del ciclo de replicación viral. Durante la retrotranscripción viral la TR sintetiza una cadena de ADN complementaria al ARN viral. Esta enzima tiene la característica de que no corrige los errores durante la síntesis de la cadena de ADN, ya que no presenta la actividad de exonucleasa en su extremo 3' (apareciendo una tasa de 1 error por cada  $10^5$  nucleótidos). Como consecuencia, se presenta variabilidad genética que afecta diversidad, persistencia, tropismo, capacidad de replicación, citopatogenicidad y desarrollo de la enfermedad. La acumulación de mutaciones permite las variaciones en las estructuras terciarias de las proteínas y la coexistencia de subpoblaciones virales heterogéneas (De Andrés *et al*, 2005; Rauddi, 2005; Castro *et al*, 1999; Wain-Hobson, 1996); factores que favorecen la producción insuficiente de anticuerpos neutralizantes. Además, la integración del ADN proviral en el genoma de la célula le permite al virus preservar su genoma, asegurar su replicación y producir una infección persistente. El virus entonces, no es detectado por el sistema inmune hasta que se activa la maquinaria de replicación celular (período conocido como de latencia viral), que ocurre cuando el monocito madura hacia macrófago. (Rauddi, 2005; Tesoro *et al*, 2003; Test *et al*, 1999; Reddy *et al*, 1993). Gendelman *et al*. (1985) estudiaron el mecanismo de persistencia del VAEC, observando que la médula ósea funciona como un reservorio al existir grupos de células infectadas precursoras de monocitos que participarán en la patogenia a partir de que dejen la médula ósea, concluyendo que la expresión viral es restringida por factores de tejidos específicos. De este modo, el tiempo necesario para la seroconversión puede variar desde 10 días hasta 2 años post-infección (Blacklaws *et al*, 2004).

Actualmente, existe la necesidad de desarrollar pruebas de calidad a gran escala y que puedan ser automatizadas para permitir la evaluación de un gran número de muestras (Saman *et al*, 1999). La producción de proteínas virales recombinantes tiene un amplio uso en el desarrollo de pruebas para la detección de anticuerpos contra LVPR. El uso de esta tecnología evita los retrasos causados por la producción ineficiente de antígenos virales obtenidos por cultivo de células *in vitro*, donde la técnica y el costo para la purificación de las proteínas son dos puntos importantes a tomar en cuenta (Simard *et al*, 2001; Saman *et al*, 1999, Zaroni *et al*, 1991). En cambio, se han

desarrollado distintas pruebas serológicas que incluyen la sobreexpresión de proteínas recombinantes virales codificadas en los genes *gag* y *pol*. El uso de mezclas de estas proteínas aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba desarrollada (De Andrés *et al*, 2005; Pasick, 1998).

### **Justificación**

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) causada por Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LVPR) es una enfermedad con un elevado impacto económico sobre el ganado caprino en sistemas intensivos de producción lechera. Para evitar la diseminación de los LVPR es necesario desarrollar métodos de diagnóstico capaces de detectar animales portadores en etapas tempranas de la infección, contemplando el tipo viral presente en nuestro país; ya que actualmente se importan y utilizan pruebas comerciales estandarizadas con antígeno de LVPR B sin conocer el que se presenta en México.

### **Objetivos**

#### **Objetivo General**

Diseñar y aplicar herramientas moleculares para analizar e identificar el genotipo y subtipo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes en un grupo de caprinos de la FMVZ-UNAM, y para producir antígenos recombinantes que sean la base para la elaboración de una técnica de diagnóstico serológica.

#### **Objetivos Particulares**

1. Realizar un análisis bioinformático y filogenético de LPVR como ayuda para el diseño de oligonucleótidos.
2. Diseñar oligonucleótidos que amplifiquen las regiones conservadas de los diferentes genotipos de LVPR para su uso en una prueba de PCR diagnóstico.
3. Realizar la detección molecular de LVPR mediante la técnica de PCR, utilizando muestras de ADN extraído de células mononucleares de sangre periférica de caprinos mexicanos de rebaños lecheros en sistemas intensivos.
4. Diseñar oligonucleótidos que amplifiquen los genes que codifiquen para las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM de LVPR.
5. Clonar los productos de PCR (que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM) en el plásmido pET24 y transformar la cepa BL21-Codon Plus (DE3)-RIL© de *Escherichia coli*, para sobreexpresar proteínas recombinantes que puedan ser utilizadas en una técnica de diagnóstico serológica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Análisis bioinformático y filogenético del LVPR.

Se obtuvieron las secuencias de genoma completo de los virus identificados como Artritis-Encefalitis Caprina, Lentivirus Caprino, Lentivirus Ovino, Virus de Maedi-Visna y Lentivirus de Pequeños Rumiantes, de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esto de acuerdo a la clasificación anterior y actual de los LVPR. Los números de referencia son los siguientes: A15114, AF322109, AF479638, AY445885, AY900630, EU293537, FJ195346, GQ381130, GU120138, L06906, M10608, M31646, M33677, M34193, M51543, M60609, M60610, NC\_001452, NC\_001511, S51392, S55323.

Las secuencias obtenidas se delimitaron a la región del gen *pol* y se alinearon con las secuencias ya reportadas por la literatura y disponibles en el NCBI, según los estudios de filogenética realizados en base a este gen (Reina *et al*, 2009b; Shah *et al*, 2004a; Shah *et al*, 2004b). Se utilizaron los programas BioEdit Sequence Alignment Editor, Copyright © 1997-2007 (Hall, 1999) y MEGA versión 4.0, Copyright © 1993-2008 (Tamura *et al*, 2007).

Se hicieron alineamientos pareados y múltiples de todas las secuencias y éstas se agruparon de acuerdo a los porcentajes de identidad obtenidos, considerándose los genotipos y subtipos publicados (Glaría *et al*, 2009; Reina *et al*, 2009b; Kuzmak *et al*, 2007; Shah *et al*, 2004a; Shah *et al*, 2004b). Los grupos de secuencias obtenidos fueron: uno general (todas las secuencias), uno para el genotipo A y uno para el genotipo B, se utilizó además una secuencia de genotipo E como grupo externo. Se hizo un alineamiento nuevo para estos grupos de secuencias y fueron evaluados con el programa MEGA versión 4.0 para establecer la filogenia. Los parámetros que se utilizaron fueron: método Neighbor-Joining, prueba de filogenia Bootstrap con 1000 repeticiones, modelo de evolución Kimura-2 parámetros e intervalos distribuidos proporcionalmente.

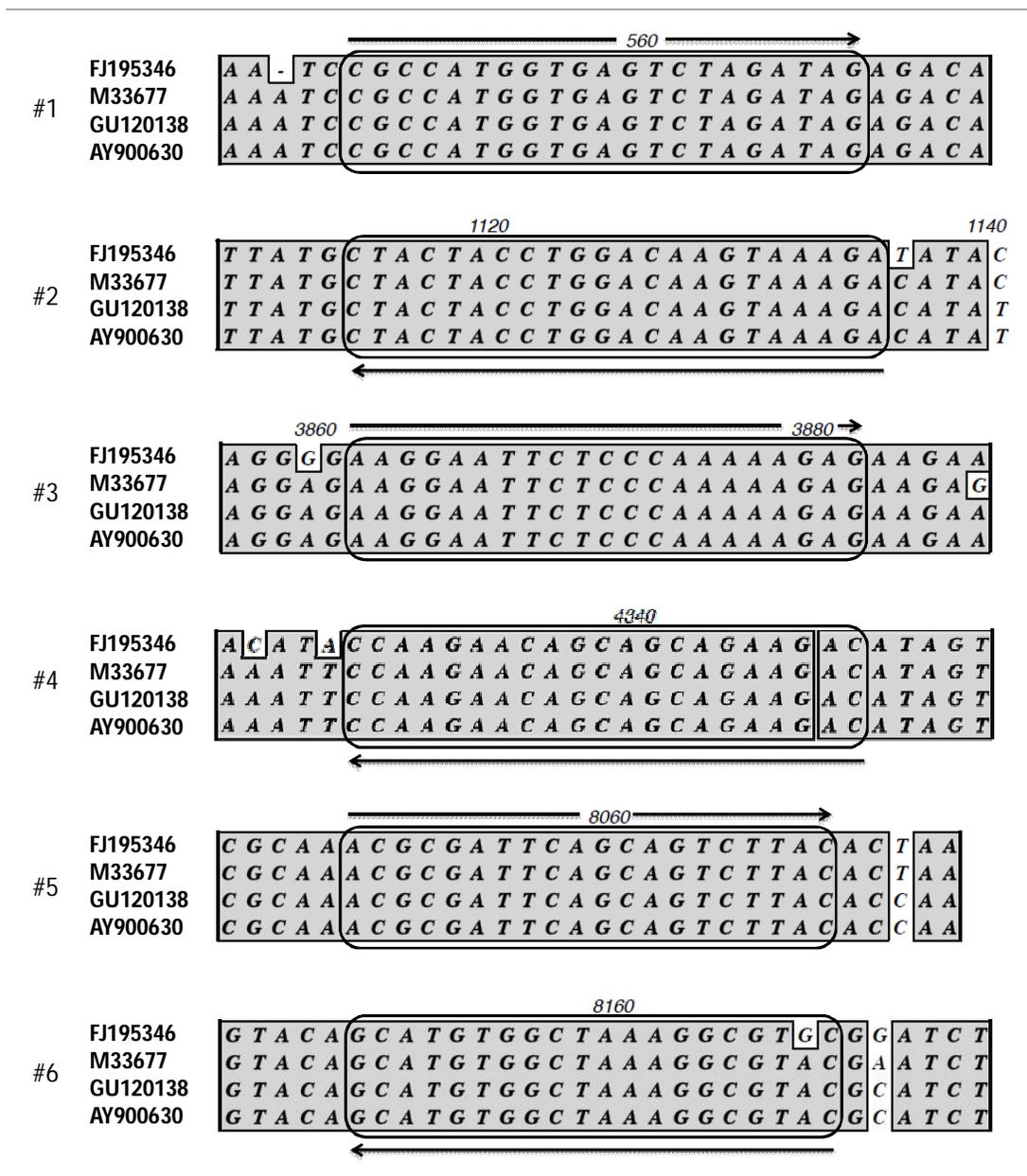
## **2. Determinación del genotipo y subtipo de LVPR mediante PCR.**

### **Diseño de oligonucleótidos para la identificación del genotipo y subtipo de LVPR.**

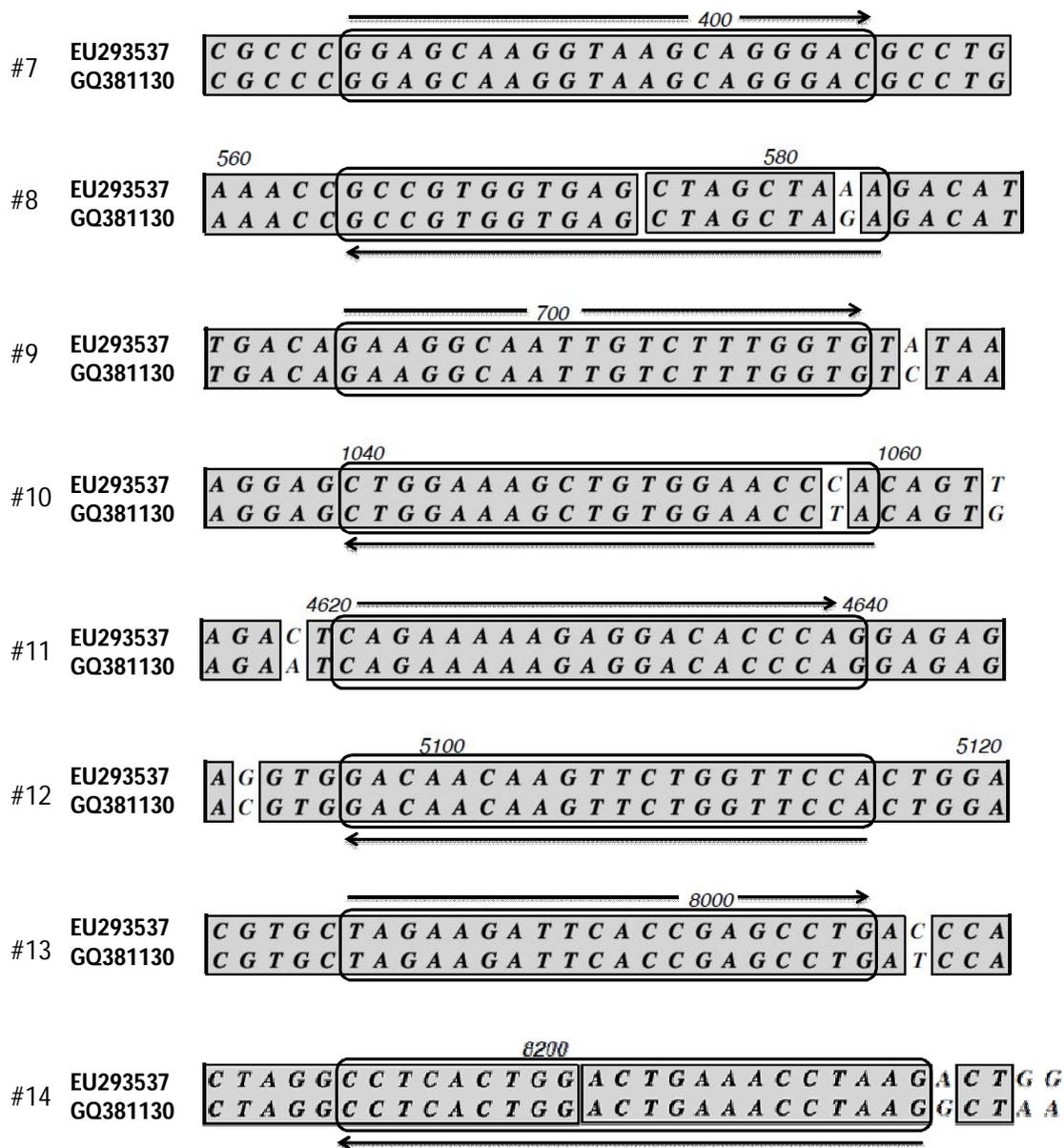
Para la identificación del genotipo y subtipo de LVPR, se diseñaron varios pares de oligonucleótidos (iniciador y reverso) para los genotipos A, B y E y otro juego de oligonucleótidos para la identificación de secuencias comunes de LVPR, utilizando las regiones conservadas a lo largo del genoma completo (Figuras 4 a 9.). Para los genotipos C y D no se diseñaron secuencias debido a que se encontró sólo una secuencia completa reportada para el genotipo C y ninguna para el genotipo D. Para localizar las regiones conservadas se utilizaron los programas Jalview versión 2.4.0.b2, 2009, The Barton Group, University of Dundee, Scotland, UK (Waterhouse *et al*, 2009) y ApE – A plasmid Editor v1.17, Copyright © 2003-2008 by M. Wayne Davis. En el diseño de estos oligonucleótidos se tomaron en cuenta las siguientes características: longitud de 20 a 25 pb; con mínimo permitido de 18pb; aproximadamente 50% GC; Tm 60°C; extremo 3' con terminación en CG, CC ó GC; evitar la formación de estructura secundaria y de dímeros de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se pueden combinar dependiendo del genotipo y subtipo de LVPR.

### **Análisis de los oligonucleótidos que identifican el genotipo y subtipo de LVPR.**

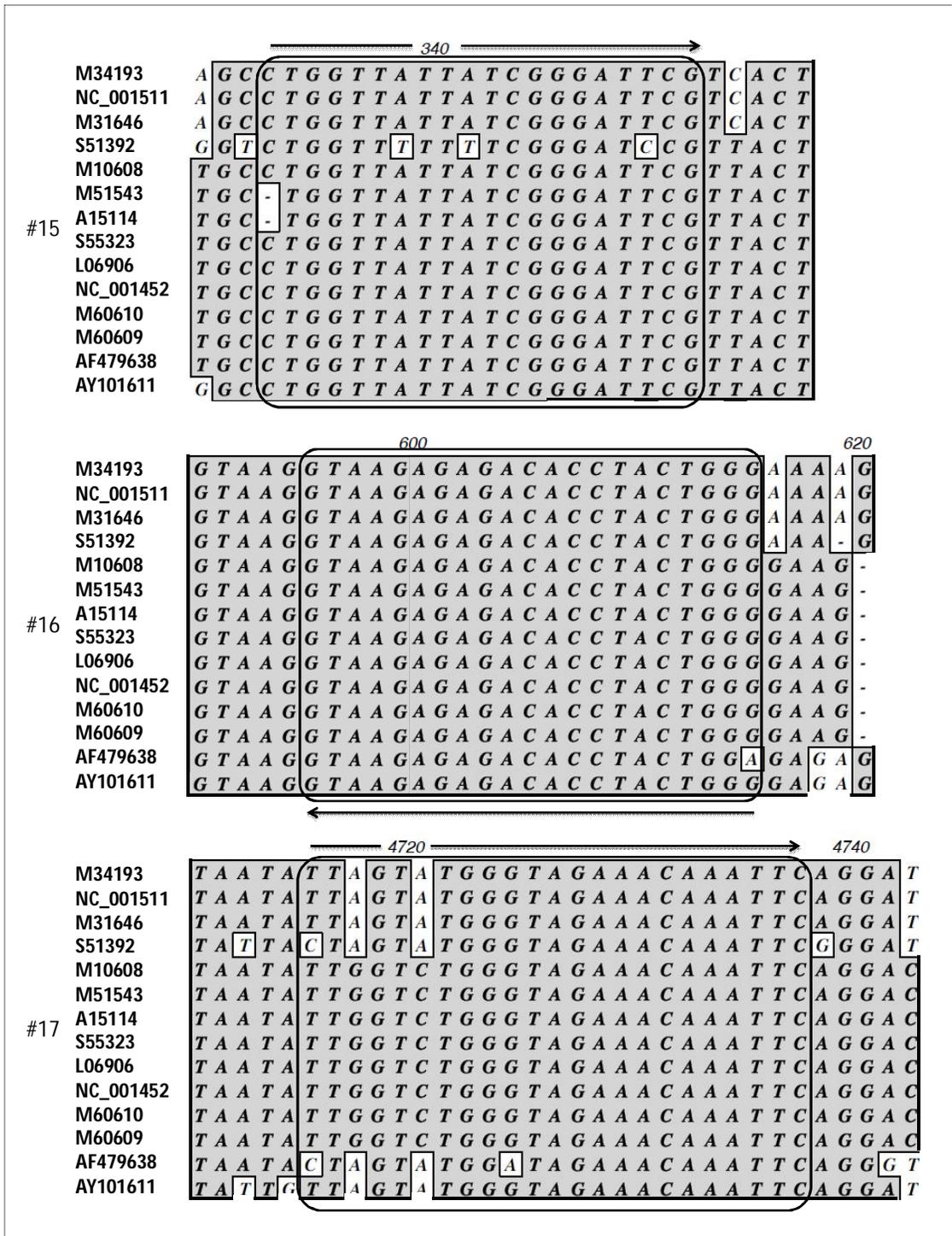
Para caracterizar los oligonucleótidos, se realizó primero una reacción control con cada oligonucleótido por separado (análisis “*single primer*”) usando como molde ADN de células mononucleares de sangre periférica del caprino seronegativo de la granja particular en la que nunca se han presentado signos clínicos de la enfermedad (Apaseo el Alto, Guanajuato). Los oligonucleótidos con reacciones inespecíficas se descartaron. Como control también se realizó una reacción de PCR donde con cada par establecido de oligonucleótidos y el plásmido pCAEVneo11 (Hotzel *et al*, 2001). Se incluyeron controles negativos para cada par de oligonucleótidos sin molde. Las condiciones de estas reacciones fueron las siguientes: ~20ng de ADN, 20µM de dNTPs, 1X de amortiguador de reacción (0.5M KCl, 0.1M Tris, 15mM MgCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% Triton x-100), 0.25µM de cada oligonucleótido, 2.5U de la enzima Taq polimerasa y agua miliQ c.b.p. 30µl. El programa de la reacción de PCR fue la siguiente: precalentamiento 94°C/2'30”; desnaturalización 93°C/30”; alineamiento 60°C/30”; extensión 72°C/1'1kb, 30 ciclos; extensión final 72°C/10'; último paso 25°C/5'. Los fragmentos de ADN se identificaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% ó 2% según el tamaño del producto amplificado.



**Figura 4.** Alineamiento de las secuencias de LVPR B1 (AY900630, GU120138, M33677) y de LVPR B2 (FJ195346), para el diseño de los oligonucleótidos orientados a la detección de LVPR B (#1 a #6).



**Figura 5.** Alineamiento de las secuencias de LVPR E (EU293537 y GQ381130) para el diseño de los oligonucleótidos orientados a su detección (#7 a #14).



**Figura 6.** Alineamiento de las secuencias de LVPR A1 (A15114, AF479638, L06906, M10608, M31646, M34193, M51543, M60609, M60610, NC\_001452, NC\_001511, S51392, S55323) y LVPR A2 (AY101611), para el diseño de los oligonucleótidos orientados a la detección de LVPR A (#15 a #20).

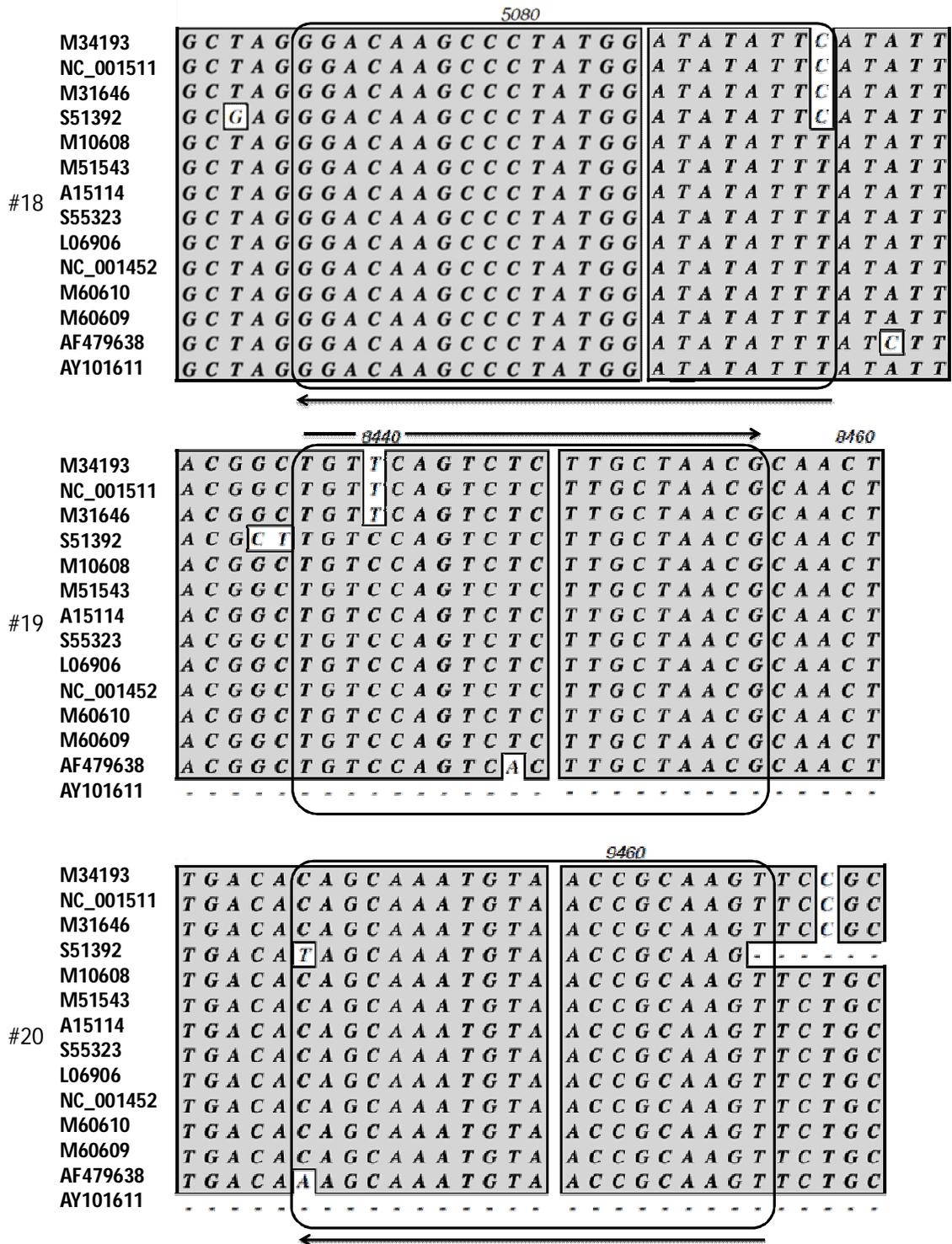
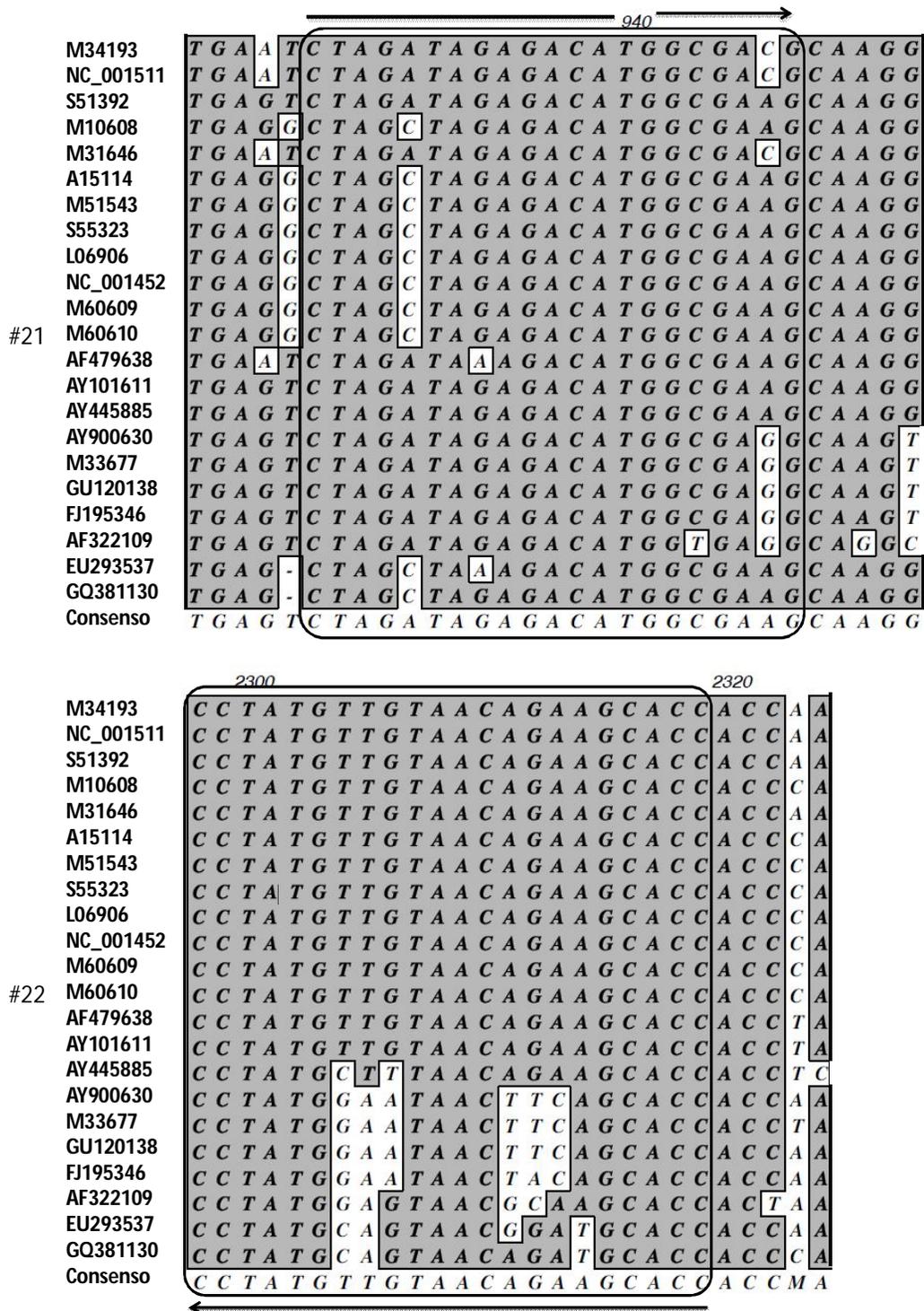
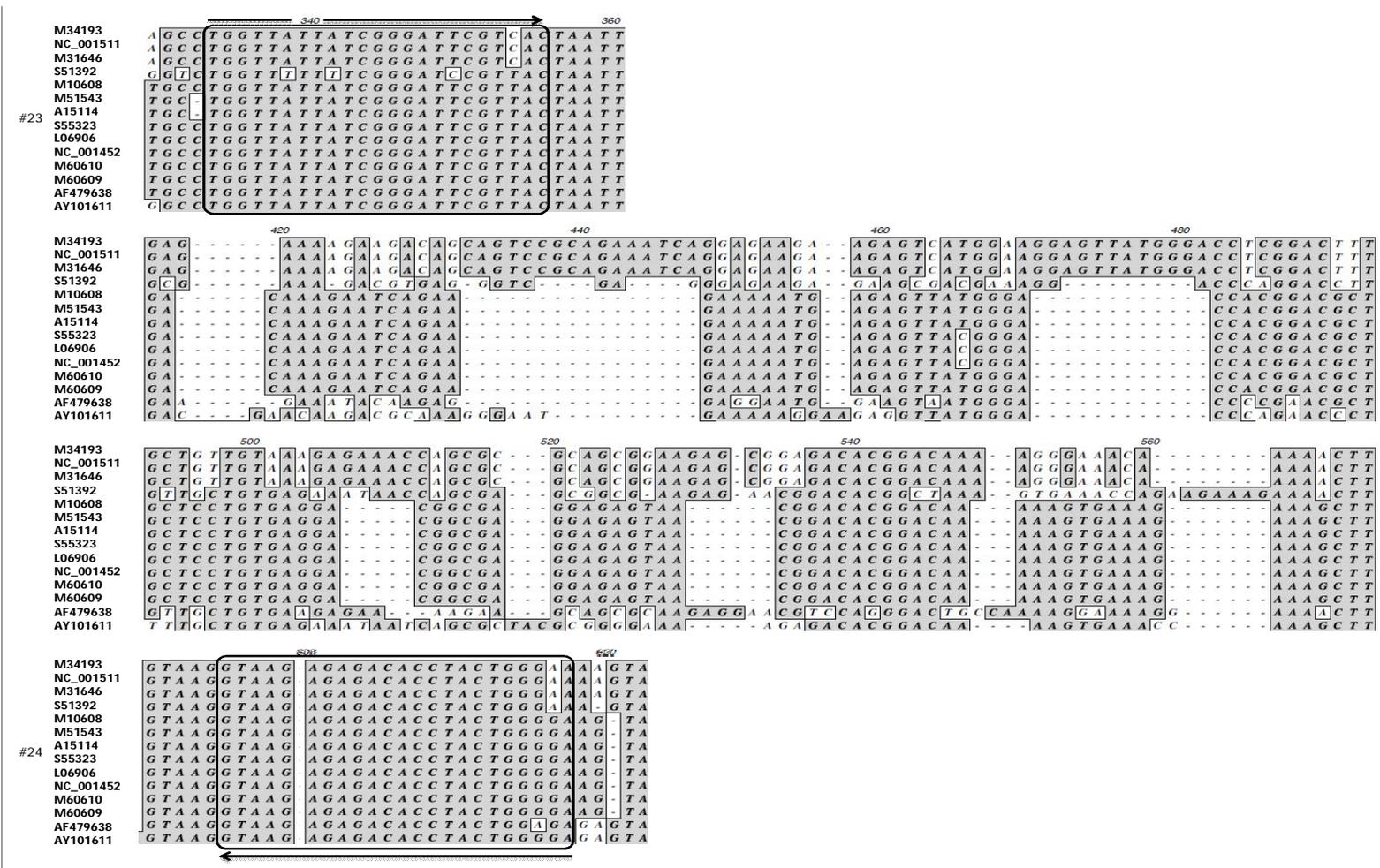


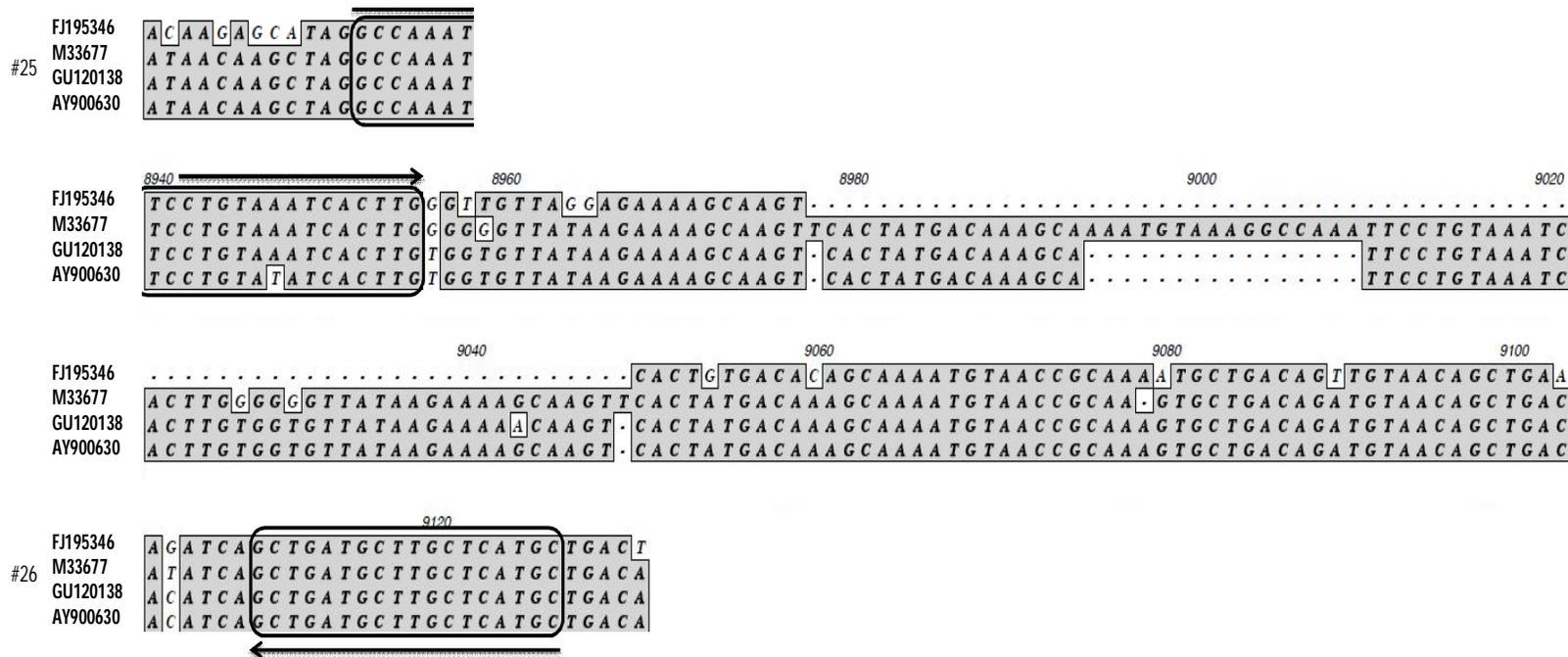
Figura 6. Continuación.



**Figura 7.** Alineamiento de todas las secuencias obtenidas en el NCBI para el diseño de los oligonucleótidos orientados a la detección de cualquier genotipo de LVPR (#21 y #22).



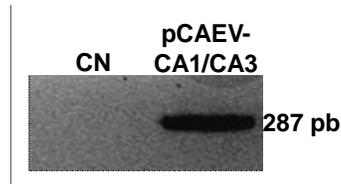
**Figura 8.** Alineamiento de las secuencias de LVPR A1 (A15114, AF479638, L06906, M10608, M31646, M34193, M51543, M60609, M60610, NC\_001452, NC\_001511, S51392, S55323) y LVPR A2 (AY101611), para el diseño de los oligonucleótidos orientados a la detección de LVPR A1 ó A2 (#23 y #24).



**Figura 9.** Alineamiento de las secuencias de LVPR B1 (AY900630, GU120138, M33677) y LVPR B2 (FJ195346) para el diseño de los oligonucleótidos orientados a la detección de LVPR B1 ó B2 (#25 y #26).

### PCR control estandarizado.

El plásmido pCAEVneo11 (Hotzel *et al*, 2001) se utilizó como molde con el juego de oligonucleótidos CA1/CA3 que amplifican un fragmento del gen *gag* (Reddy *et al*, 1993) (Figura 10.). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: ~20ng de ADN, 20µM de dNTPs, 1X de amortiguador de reacción (0.5M KCl, 0.1M Tris, 15mM MgCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% Triton x-100), 0.25µM de cada oligonucleótido, 2.5U de la enzima Taq polimerasa y agua miliQ c.b.p. 30µl. El programa de la reacción de PCR fue la siguiente: precalentamiento 95°C/2'30"; desnaturalización 93°C/30"; alineamiento 65°C/30"; extensión 72°C/18", 30 ciclos; extensión final 72°C/7'; último paso 25°C/5'. Los fragmentos de ADN de 287pb, se identificaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

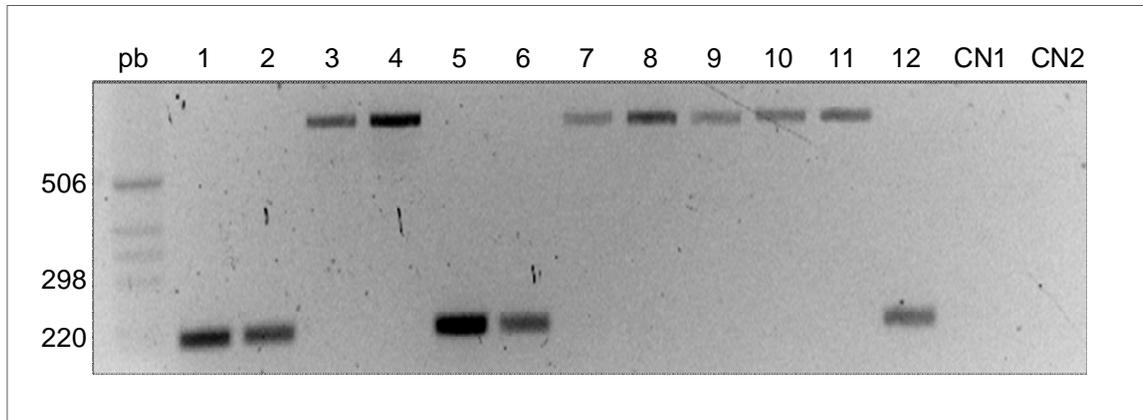


**Figura 10.** Reacción de PCR con el juego de los oligonucleótidos CA1/CA3 y el plásmido pCAEVneo11 como molde, se observa la banda esperada de 287pb. CN: control negativo para la reacción.

### Muestras clínicas.

Se obtuvieron, por minigradientes de FICOLL, células mononucleares de sangre periférica (PMBC) de caprinos pertenecientes a la FMVZ-UNAM y de un caprino de una granja particular en la que nunca se han presentado signos clínicos de la enfermedad (Apaseo el Alto, Guanajuato). El suero de los animales se probó por ELISA competitivo para la detección de anticuerpos contra las proteínas gp135-SU y p28-CA del Virus de Artritis-Encefalitis Caprina (LVPR B) (CAEV Antibody Test Kit, VMRD, Inc. © 2009.) La nomenclatura se estableció como sigue: 1, caprino de granja particular con resultado seronegativo; 2 y 3, caprinos de la FMVZ-UNAM con resultado seronegativo; 4 a 12, caprinos de la FMVZ-UNAM con resultado seropositivo. Se obtuvo ADN genómico a partir de estas muestras mediante la técnica comercial QIAamp DNA mini Blood (© QIAGEN 2003 – 2011). El ADN extraído se visualizó en gel de agarosa al 1% para comprobar la presencia de ADN en la muestra. La pureza de los ADN genómicos se comprobaron con una

reacción de PCR con oligonucleótidos diseñados contra el gen de la caseína  $\alpha 1$  de caprinos (Torres-Vázquez *et al*, 2008) (Figura 11.).



**Figura 11.** Detección de polimorfismos del gen de la caseína  $\alpha 1$  de caprinos (Torres-Vázquez *et al*, 2008). Las bandas esperadas pueden ser de 205pb ó 662pb. 1 a 12: ADN de PMBC de los 12 caprinos evaluados; CN1: se utilizó el plásmido pCAEVneo11 como molde; CN2: control negativo para la reacción; pb: pares de bases.

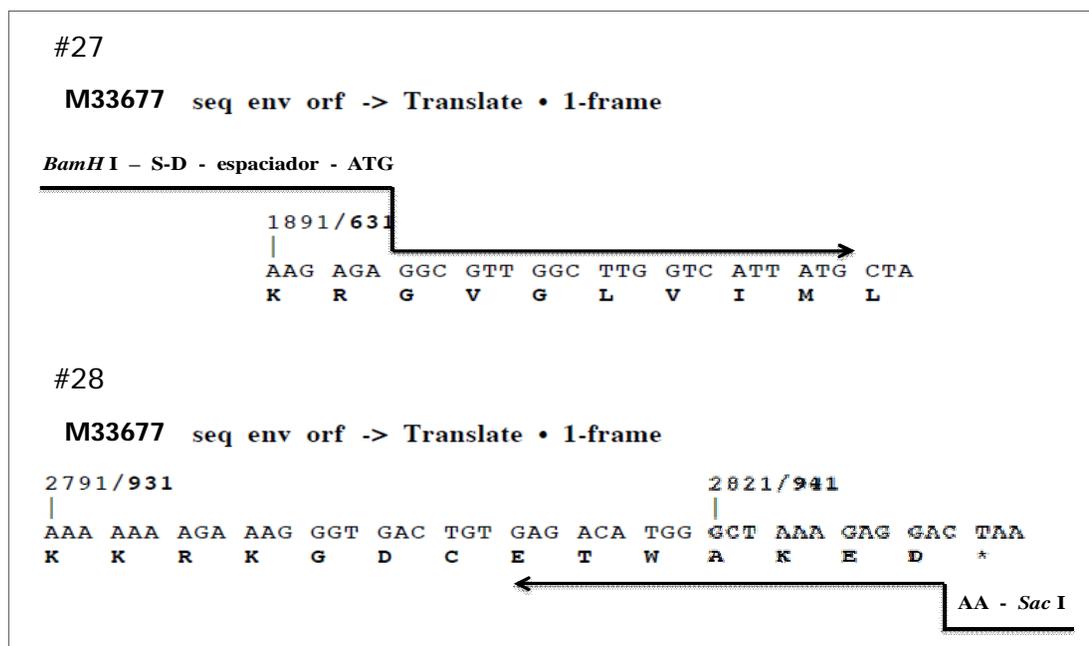
### PCR de muestras clínicas

Se realizaron varias reacciones de PCR con cada par establecido de oligonucleótidos, utilizando como molde 3 de las muestras de ADN de PMBC de caprino. Las amplificaciones observadas orientaron el trabajo a la detección del LVPR B1. Se probaron 5 pares de oligonucleótidos, 2 de ellos establecidos. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes:  $\leq 500$ ng de ADN, 20 $\mu$ M de dNTPs, 1X de amortiguador de reacción (0.5M KCl, 0.1M Tris, 15mM MgCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% Triton x-100), 0.25 $\mu$ M de cada oligonucleótido, 2.5U de la enzima Taq polimerasa y agua miliQ c.b.p. 30 $\mu$ l. El programa de la reacción de PCR fue la siguiente: precalentamiento 94°C/2'30"; desnaturalización 93°C/30", alineamiento 60°C/30", extensión 72°C/1'1kb, 30 ciclos; extensión final 72°C/10'; último paso 25°C/5'. Los fragmentos de ADN se identificaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% ó 2% según el tamaño del producto amplificado.

### 3. Amplificación de secuencias que codifican proteínas estructurales de LVPR B1.

#### Diseño de oligonucleótidos

Para la sobreexpresión de proteínas recombinantes se diseñaron oligonucleótidos que amplifican regiones que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM del LVPR B1. Las características consideradas en el diseño son: 1) El oligonucleótido iniciador tiene el sitio de restricción *BamH* I, requerido para su clonación en el plásmido pET24, la secuencia Shine-Dalgarno, una secuencia espaciadora, el codón de inicio ATG y la secuencia complementaria al gen de interés con una longitud aproximada de 21pb. 2) El oligonucleótido reverso, tiene el sitio de restricción *Sac* I ó *Xho* I requerido para su clonación en el plásmido pET24 y la secuencia complementaria al gen con una longitud aproximada de 21pb que no incluya codón de término (Figuras 12 a 16.). El oligonucleótido deja a la secuencia en fase con la que codifica para el marcador epítipo de histidinas localizada en el plásmido. Los oligonucleótidos integrantes de los pares establecidos pueden ser intercambiables dependiendo de la región del genoma de LVPR y pueden ser utilizados para la identificación de LVPR B1. Los oligonucleótidos diseñados para la sobreexpresión de proteínas recombinantes pueden utilizarse para el diagnóstico de LVPR B1.

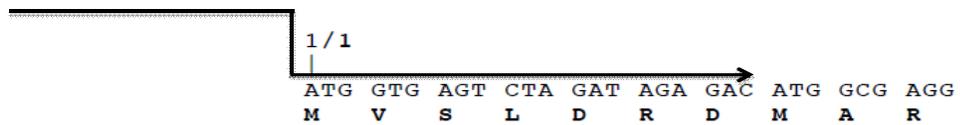


**Figura 12.** Diseño de los oligonucleótidos #27 y #28 en el mapa de traducción de la secuencia M33677 (LVPR B1). Delimitan la secuencia que codifica para TM. Se indican el número de nucleótido/aminoácido para el marco de lectura abierto del gen *env*.

#29

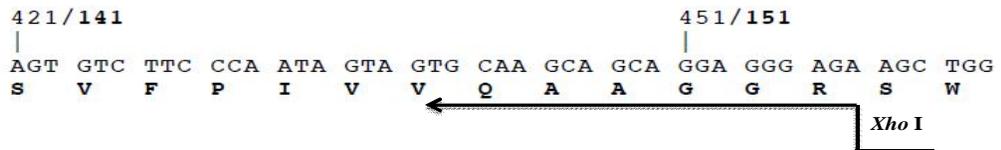
M33677 seq gag orf -> Translate • 1-frame

BamHI - S-D - espaciador



#30

M33677 seq gag orf -> Translate • 1-frame

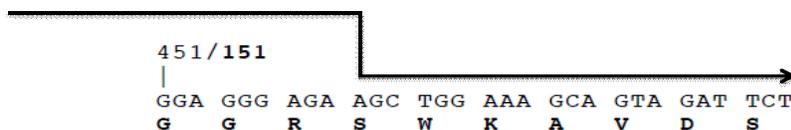


**Figura 13.** Diseño de los oligonucleótidos #29 y #30 en el mapa de traducción de la secuencia M33677 (LVPR B1). Delimitan la secuencia que codifica para MA. Se indican el número de nucleótido/aminoácido para el marco de lectura abierto del gen *gag*.

#31

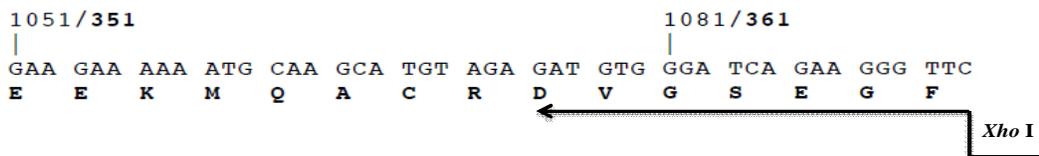
M33677 seq gag orf -> Translate • 1-frame

BamHI - S-D - espaciador - ATG

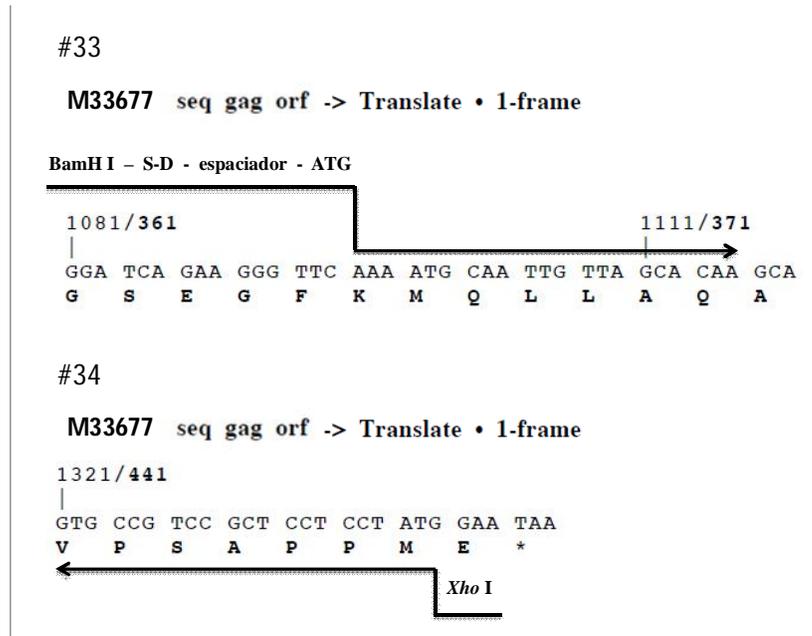


#32

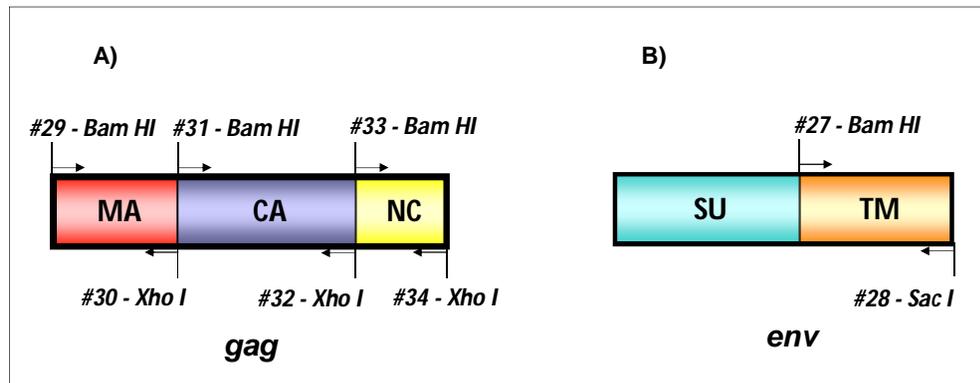
M33677 seq gag orf -> Translate • 1-frame



**Figura 14.** Diseño de los oligonucleótidos #31 y #32 en el mapa de traducción de la secuencia M33677 (LVPR B1). Delimitan la secuencia que codifica para CA. Se indican el número de nucleótido/aminoácido para el marco de lectura abierto del gen *gag*.



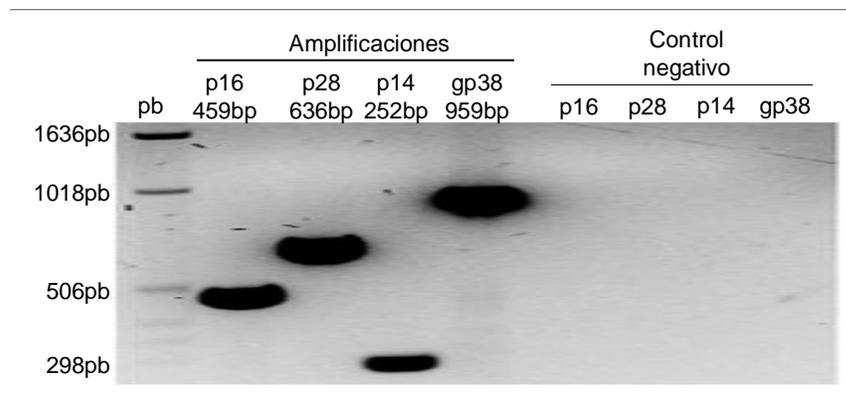
**Figura 15.** Diseño de los oligonucleótidos #33 y #34 en el mapa de traducción de la secuencia M33677 (LVPR B1). Delimitan la secuencia que codifica para NC. Se indican el número de nucleótido/aminoácido para el marco de lectura abierto del gen *gag*.



**Figura 16.** Localización de los oligonucleótidos para amplificar las secuencias que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM de LVPR B1. A) Región del gen *gag*. B) Región del gen *env*. Fragmento #29/#30: 459bp; fragmento #31/#32: 636bp; fragmento #33/#34: 252bp; fragmento #27/#28: 959bp. #27 a #34: oligonucleótidos diseñados; MA: localización de la secuencia que codifica para la proteína p16-MA; CA: localización de la secuencia que codifica para la proteína p28-CA; NC: localización de la secuencia que codifica para la proteína p14-NC; SU: localización de la secuencia que codifica para la proteína gp135-SU; TM localización de la secuencia que codifica para la proteína gp38-TM.

### Amplificación de secuencias

Los fragmentos de ADN para la sobreexpresión de proteínas recombinantes, se amplificaron a partir del plásmido pCAEVneo11. Las secuencias seleccionadas codifican las proteínas virales p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM (Figura 16.). En la reacción de PCR se utilizó una polimerasa de ADN de alta fidelidad (Phusion High-Fidelity DNA Polimerase, F-530S, New England Biolabs, Inc.). Las condiciones de la reacción de PCR se establecieron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante:  $\leq 10\text{ng}$  de ADN,  $200\mu\text{M}$  de dNTPs, 1X de amortiguador de reacción,  $0.5\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido,  $0.3\mu\text{l}$  de ADN Taq polimerasa y agua miliQ c.b.p.  $30\mu\text{l}$ . El programa de la reacción de PCR fue la siguiente: calentamiento  $98^{\circ}\text{C}/30''$ ; desnaturalización  $98^{\circ}\text{C}/10''$ , alineamiento  $3^{\circ}\text{C}+1/30''$ , extensión  $72^{\circ}\text{C}/30''$  1kb, 30 ciclos; extensión final  $72^{\circ}\text{C}/10''$ ; último paso  $4^{\circ}\text{C}/\text{mantener}$ . Los productos de PCR se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 17). Los productos de PCR se purificaron por el método de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol. El ADN se resuspendió en  $30\mu\text{l}$  de Tris  $10\text{mM}$ .



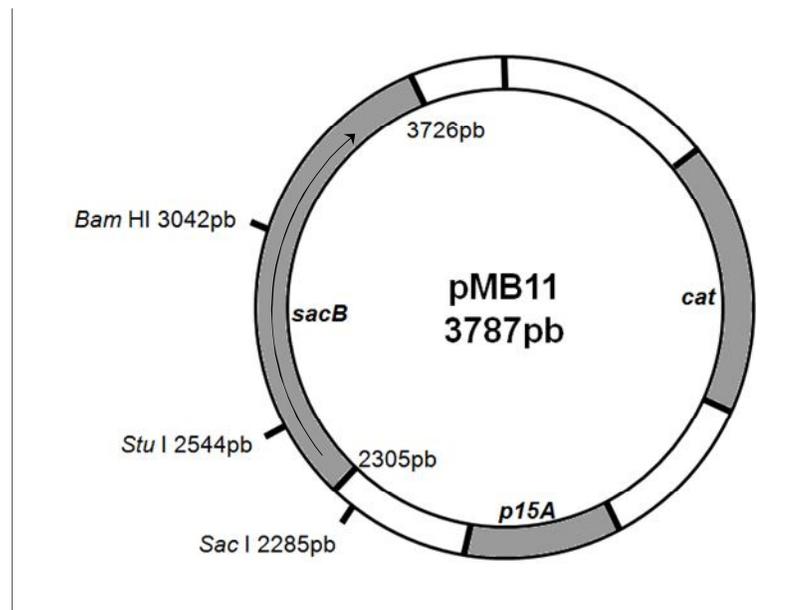
**Figura 17.** Reacción de PCR para la amplificación de productos que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM. Se indica la longitud de bases esperada de cada amplificación; pb: pares de bases.

<sup>1</sup> Agregar  $3^{\circ}\text{C}$  más que la  $T_m$  del oligonucleótido con la  $T_m$  más baja.

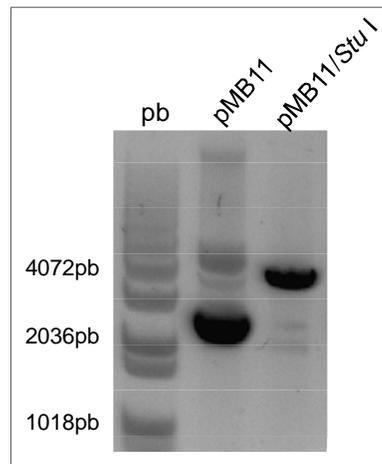
#### 4. Transformación de *E. coli* BL21–Codon Plus (DE3)–RIL©.

##### Clonación de los fragmentos p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM en pMB11.

Como vector para clonar los productos de PCR se utilizó el plásmido pMB11 (Briones, 2008). Se clonaron los productos que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM. El pMB11 tiene un tamaño de 3787pb. Contiene el gen *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa) como marcador de selección, el origen de replicación *p15A* y el gen *sacB* (levansacarasa) como marcador para contra-seleccionar clonas positivas. El producto de *sacB* (levansacarasa) es letal para bacterias Gram negativas en presencia de sacarosa, sin embargo, si *sacB* es interrumpido mediante la inserción de un producto de PCR, la levansacarasa no se sintetiza y las transformantes que puedan crecer en presencia de sacarosa son clonas positivas. El pMB11 se utiliza para clonar fragmentos de ADN con extremos romos (Figura 18). El plásmido se digirió con 10U de la enzima *Stu* I (Figura 19) en un volumen final de reacción de 40µl, con 100µg/ml de ASB y 1X del amortiguador No. 4 (New England Biolabs©, Inc). La reacción se incubó a 37°C durante 3 horas. El plásmido pMB11/*Stu*I se purificó de gel con el sistema comercial PureYield™ Plasmid Miniprep (©2011 Promega Corporation), y se eluyó en 40µl Tris10mM.



**Figura 18.** Mapa gráfico del plásmido pMB11. Se indica la localización del gen *sacB* y los sitios únicos de corte para *Bam*HI, *Sac* I y *Stu* I. *p15A*: origen de replicación; *cat*: gen que confiere resistencia al cloranfenicol (cloranfenicol acetiltransferasa) (Briones, 2008).



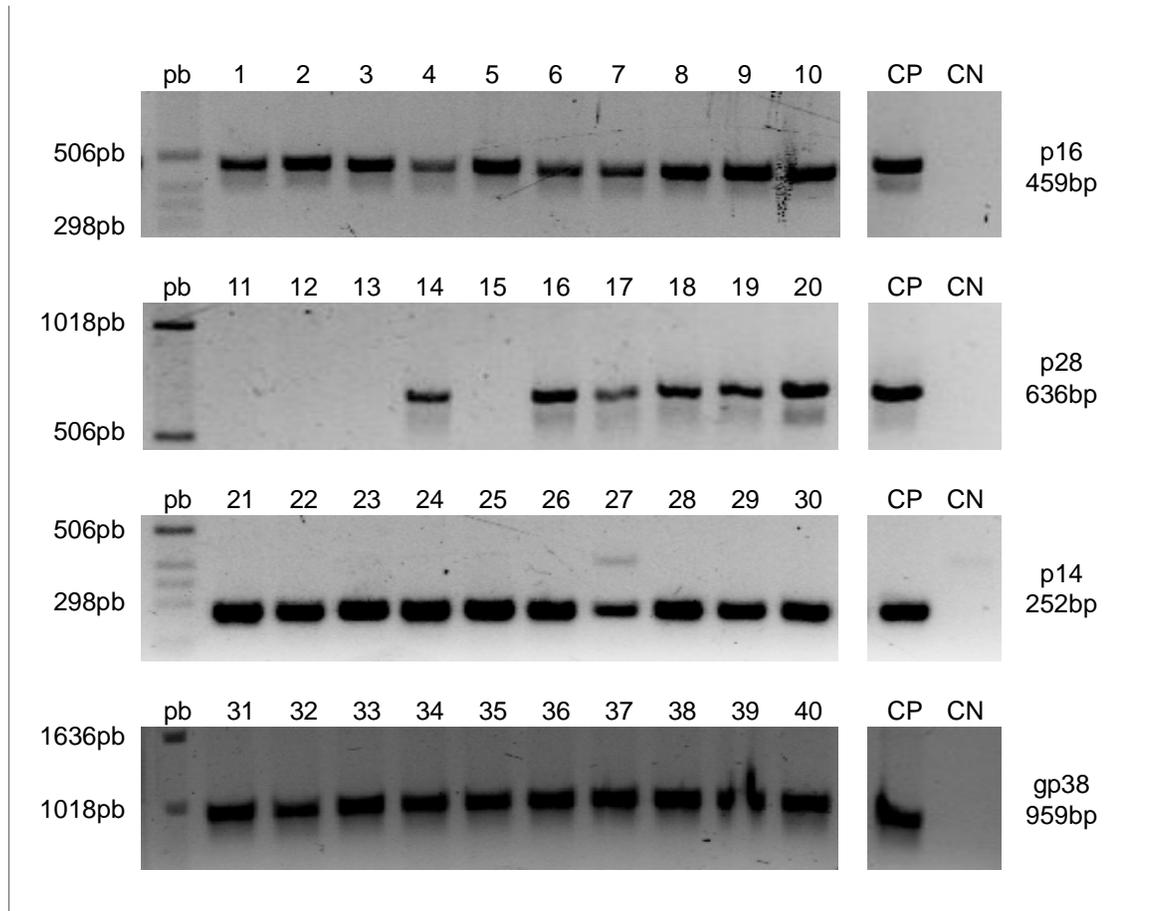
**Figura 19.** Digestión del plásmido pMB11 (~500ng) con 10U de la enzima *Stu* I. pMB11: plásmido sin digerir; pMB11 / *Stu* I: plásmido digerido; pb: pares de bases.

La ligación se realizó con el plásmido pMB11/*Stu*I (~50ng) y los fragmentos amplificados a partir del pCAEVneo11 que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM, en una proporción inserto:vector de 3:1. Para la reacción de ligación se utilizó 200 U de T4 ADN ligasa (New England Biolabs®, Inc) y amortiguador de ligación 1X (Promega Corporation) en un volumen final de 20µl. La reacción se incubó a 4°C durante 12 horas. El ADN se purificó por el método de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol y se resuspendió en 20µl de Tris 10mM. Los plásmidos clonados se denominaron pMB11/MA, pMB11/CA, pMB11/NC y pMB11/TM.

#### **Transformación de *E. coli* DH10 con las reacciones de ligación pMB11/MA, pMB11/CA, pMB11/NC y pMB11/TM.**

Las reacciones de ligación se transformaron por electroporación en la cepa DH10 de *Escherichia coli* ( $F^-$  *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15* $\Delta$ *lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK*  $\lambda^-$  *rpsL* *nupG*) (Calvin & Hanawalt, 1988). Para cada transformación se utilizaron 2µl (1/10 de la reacción) de cada una de las reacciones de ligación y 30µl de células DH10 electrocompetentes. Como control se utilizaron 30µl de células DH10 electrocompetentes sin transformar. La electroporación se llevó a cabo con el protocolo predeterminado para bacteria *E. coli* con un pulso eléctrico de 1.8kV, 200Ω, 250µF por 1ms (Gene Pulser Xcell Electroporation System™ Bio-Rad Laboratories, Inc.). Después de la electroporación,

se agregaron 600µl de medio SOC (triptona, extracto de levaduras, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, glucosa) y se incubó con agitación a 30°C durante una hora. Las transformaciones se seleccionaron en cajas de medio LB con 20µg/ml de cloranfenicol, 5% de sacarosa, 1.5% de agar y se incubaron a 30°C por 24 hrs. Para comprobar que las transformantes contienen el producto de PCR, se realizó PCR de colonia con las siguientes condiciones: 20µM de dNTPs, 1X de amortiguador de reacción (0.5M KCl, 0.1M Tris, 15mM MgCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% Triton x-100), 0.25µM de cada oligonucleótido, 2.5U de la enzima ADN Taq polimerasa y agua miliQ c.b.p. 30µl. El programa de la reacción de PCR fue la siguiente: calentamiento 94°C/3'; desnaturalización 94°C/45", alineamiento 65°C/30", extensión 72°C/1'1kb, 25 ciclos; extensión final 72°C/10'; último paso 25°C/5'. Los fragmentos de ADN se identificaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2% (Figura 20).



**Figura 20.** PCR de 40 colonias de *E. coli* DH10, para detectar las clonas positivas para las secuencias que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM (10 colonias por cada transformación). Se indica la longitud de bases esperada de cada amplificación. 1 a 40: colonias transformadas de *E. coli* DH10; pb: pares de bases.

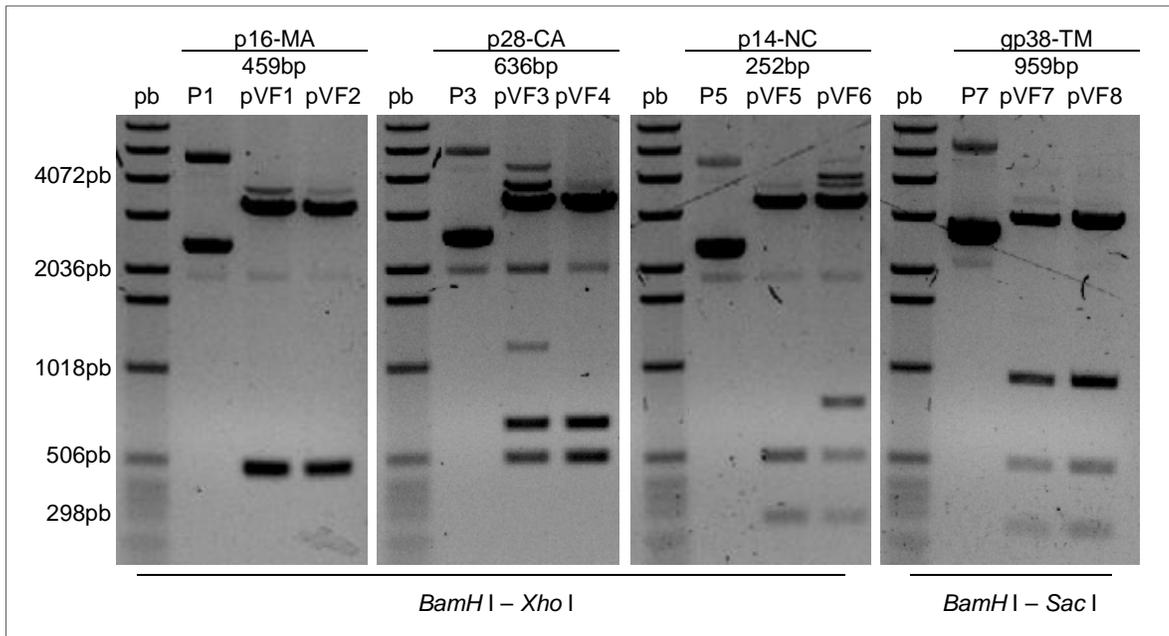
Se escogieron 2 colonias positivas de cada una de las cuatro transformaciones y se crecieron cultivos en 5ml de medio líquido LB Cm20 (20µg/ml de cloranfenicol). Se tomaron 3ml para extraer ADN plasmídico con el sistema comercial PureYield™ Plasmid Miniprep (©2011 Promega Corporation) y el ADN se eluyó en 40µl Tris10mM. Las cepas se guardaron en 10% glicerol a -80°C. Los plásmidos generados se encuentran descritos en el Cuadro 3.

**Cuadro 3**  
**CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS 1 A 8**  
**OBTENIDAS POR ELECTROPORACIÓN**

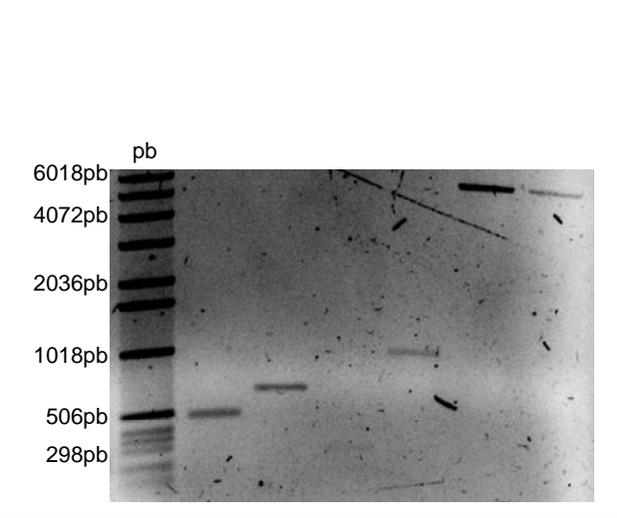
Cepa	Cepa receptora	Plásmido	Característica del plásmido	Resistencia
1	DH10	pVF1	pMB11/MA	Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>R</sup>
2	DH10	pVF2	pMB11/MA	Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>R</sup>
3	DH10	pVF3	pMB11/CA	Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>R</sup>
4	DH10	pVF4	pMB11/CA	Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>R</sup>
5	DH10	pVF5	pMB11/NC	Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>R</sup>
6	DH10	pVF6	pMB11/NC	Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>R</sup>
7	DH10	pVF7	pMB11/TM	Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>R</sup>
8	DH10	pVF8	pMB11/TM	Cm <sup>R</sup> , Sac <sup>R</sup>

#### **Subclonación de los fragmentos en pET24**

Se obtuvieron fragmentos de ADN con la secuencia que codifica para las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM a partir de la digestión de los plásmidos pVF1 a pVF8. Los plásmidos pVF1 a pVF6 (~500ng cada uno) se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*H I y *Xho* I, y los plásmidos pVF7 y pVF8 (~500ng) se digirieron con *Sac* I y con *Bam*H I. La reacción de digestión es 100µg/ml de ASB, 1X del amortiguador de digestión, 0.5U de *Bam*H I, *Sac* I o *Xho* I, en un volumen final de 30µl (New England Biolabs®, Inc). Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 horas. Los productos de cada digestión se identificaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Los productos de las digestiones *Bam*H I/*Xho* I y *Bam*H I/*Sac* I se purificaron de gel utilizando el sistema comercial QIAquick Gel Extraction (© QIAGEN 2003 – 2011) (Figuras 21 y 22).



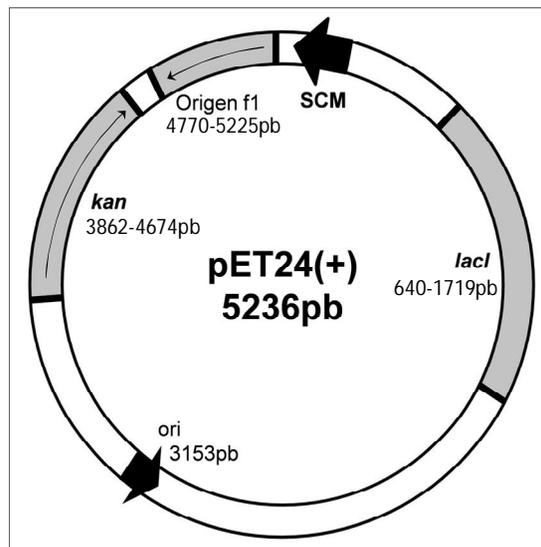
**Figura 21.** Digestiones completas de los plásmidos pVF1 a pVF6 (*BamH I-Xho I*) y pVF7, pVF8 (*BamH I-Sac I*). En la parte superior se indica el fragmento deseado y la longitud de bases esperada. P1: pVF1 sin digerir; P3: pVF3 sin digerir; P5: pVF5 sin digerir; P7: pVF7 sin digerir; pb: pares de bases.



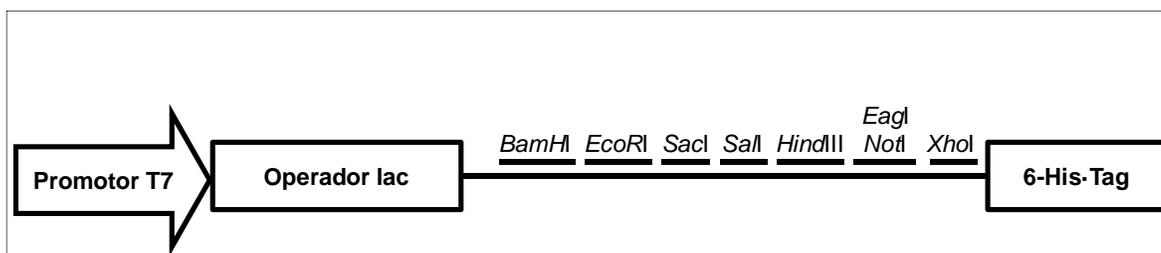
**Figura 22.** Purificaciones de gel de los fragmentos digeridos p16-MA, p28-CA, p14-NC (*BamH I-Xho I*), gp38-TM (*BamH I-Sac I*), pET24/*BamH I-Xho I* (P1) y pET24/*BamH I-Sac I* (P2). Se indica la longitud de los fragmentos. pb: pares de bases.

El plásmido pET24 (Novagen, Cat. No. 69772-3) tiene un cassette de resistencia a kanamicina, un promotor para la ADN polimerasa de T7, el gen *lacI* que codifica para el represor del promotor de *lac* y una secuencia que codifica para un marcador epitope de histidinas para fusiones en el extremo carboxilo terminal (Figuras 23 y 24.). Este plásmido (~500ng por reacción) se digirió con las enzimas de restricción *BamH*I/*Xho*I y *BamH*I/*Sac*I, (con las mismas condiciones descritas arriba), para generar extremos complementarios a los extremos cohesivos de los fragmentos MA/*BamH*I-*Xho*I, CA/*BamH*I-*Xho*I, NC/*BamH*I-*Xho*I y TM/*BamH*I-*Sac*I, obtenidos de los plásmidos pVF1, pVF3, pVF5 y pVF7 respectivamente. Los fragmentos y el pET24 se purificaron de gel utilizando el sistema comercial QIAquick Gel Extraction (© QIAGEN 2003 – 2011) (Figuras 25 y 22.).

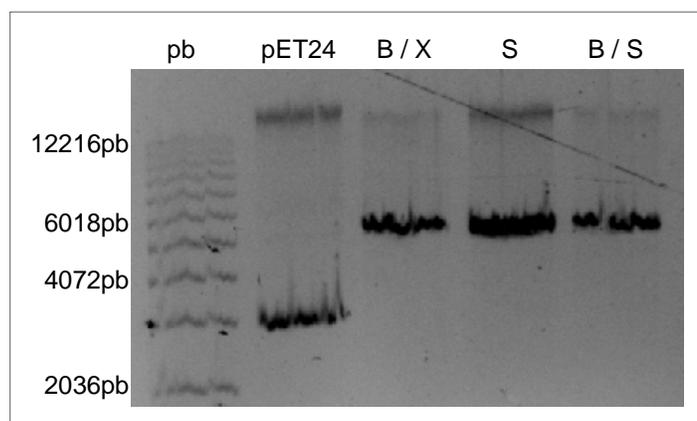
El plásmido pET24 (Novagen, Cat. No. 69772-3) digerido se ligó con los fragmentos MA/*BamH*I-*Xho*I, CA/*BamH*I-*Xho*I, NC/*BamH*I-*Xho*I y TM/*BamH*I-*Sac*I. La reacción de ligación se realizó de la misma forma en que esta descrita arriba.



**Figura 23.** Mapa gráfico del plásmido pET24. Se indica la localización del gen *kan* (resistencia a la kanamicina, aminoglucósido fosfotransferasa), del gen *lacI* (gen represor del operón *lac*) y del sitio de clonación múltiple (SCM).



**Figura 24.** Sitio de clonación múltiple del plásmido pET24 (Novagen, Cat. No. 69772-3). Se indica la localización de los sitios únicos de corte para las enzimas de restricción *BamH* I, *Sac* I y *Xho* I, y de la secuencia que codifica para el marcador epítipo de histidinas (6-His-Tag).

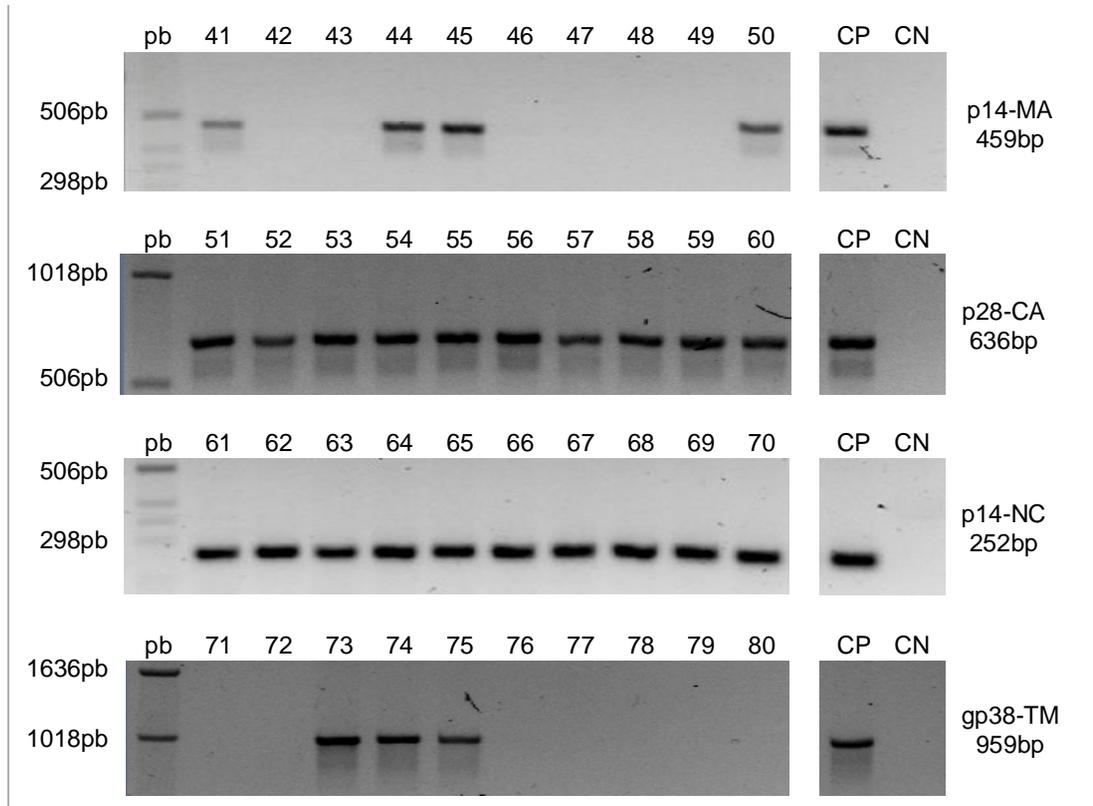


**Figura 25.** Digestiones del plásmido pET24 (~500ng por reacción) con las enzimas de restricción *BamH* I/*Xho* I y *BamH* I/*Sac* I. pET24: plásmido sin digerir; B-X: plásmido pET24 digerido con las enzimas *BamH* I-*Xho* I; S: plásmido pET24 digerido con la enzima *Sac* I; B-S: plásmido pET24 digerido con las enzimas *BamH* I-*Sac* I; pb: pares de bases.

#### Transformación de *E. coli* DH10 con las reacciones de ligación con pET24

La cepa DH10 de *E. coli* se transformó por electroporación con las ligaciones pET24(+)/MA, pET24(+)/CA, pET24(+)/NC y pET24(+)/TM. Se identificaron las clonas positivas mediante PCR colonia (Figura 26.) y se guardaron las cepas de la misma forma descrita arriba. Las características de la cepa se indican en el cuadro 4. Para comprobar las clonas, se digirieron los plásmidos pVF9 a pVF14 con *BamH* I y *Xho* I, y los plásmidos pVF15 y pVF16 con *BamH* I y *Sac* I, como se

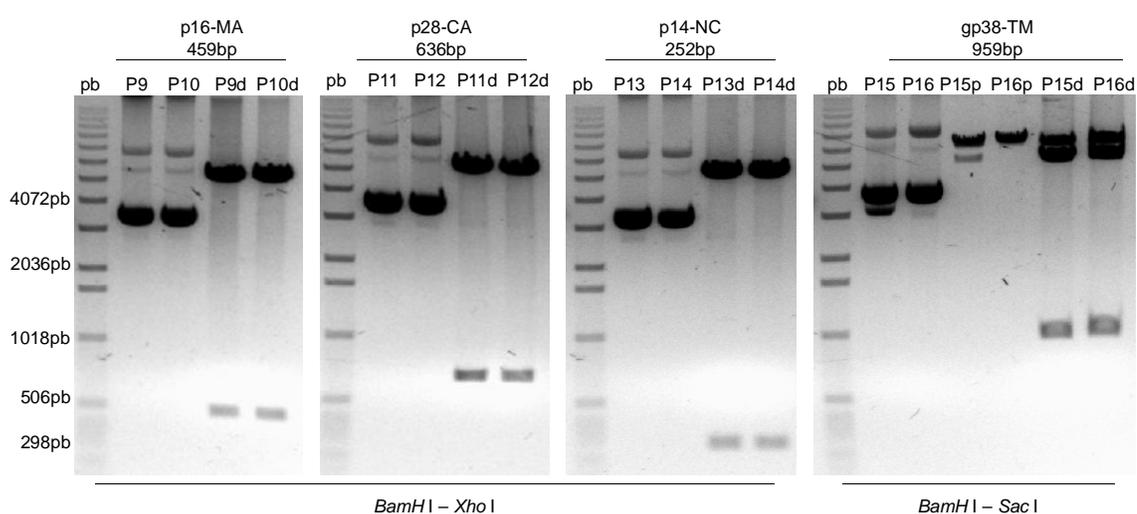
describió anteriormente. Los productos de estas digestiones se identificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Figura 27.).



**Figura 26.** PCR de 40 colonias de *E. coli* DH10, para detectar las clonas positivas para las secuencias que codifican las proteínas p16-MA, p28-CA, p14-NC y gp38-TM (10 colonias por cada transformación). Se indica la longitud de bases esperada de cada amplificación. 41 a 80: colonias transformadas de *E. coli* DH10; pb: pares de bases.

**Cuadro 4**  
**CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS 9 A 16**  
**OBTENIDAS POR ELECTROPORACIÓN**

Cepa	Cepa receptora	Plásmido	Característica del plásmido	Resistencia
9	DH10	pVF9	pET24/MA	Km <sup>R</sup>
10	DH10	pVF10	pET24/MA	Km <sup>R</sup>
11	DH10	pVF11	pET24/CA	Km <sup>R</sup>
12	DH10	pVF12	pET24/CA	Km <sup>R</sup>
13	DH10	pVF13	pET24/NC	Km <sup>R</sup>
14	DH10	pVF14	pET24/NC	Km <sup>R</sup>
15	DH10	pVF15	pET24/TM	Km <sup>R</sup>
16	DH10	pVF16	pET24/TM	Km <sup>R</sup>



**Figura 27.** Digestiones completas de los plásmidos pVF9 a pVF14 (*BamH* I-*Xho* I) y pVF15, pVF16 (*BamH* I-*Sac* I). En la parte superior se indica el fragmento deseado y la longitud de bases esperada. P9: pVF9 sin digerir; P10: pVF10 sin digerir; P9d: pVF9 digerido; P10d: pVF10 digerido; P11: pVF11 sin digerir; P12: pVF12 sin digerir; P11d: pVF11 digerido; P12d: pVF12 digerido; P13: pVF13 sin digerir; P14: pVF14 sin digerir; P13d: pVF13 digerido; P14d: pVF14 digerido; P15: pVF15 sin digerir; P16: pVF16 sin digerir; P15p: digestión parcial de pVF15 con *Sac* I; P16p: digestión parcial de pVF16 con *Sac* I; P15d: pVF15 digerido; P16d: pVF16 digerido.

**Transformación de *E. coli* BL21–Codon Plus (DE3)–RIL© con pVF9, pVF12, pVF13 y pVF16.**

La cepa *E. coli* BL21–Codon Plus (DE3)–RIL© (*E. coli* B F– *ompT hsdS*(rB– mB–) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>R</sup> *gal endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*<sup>R</sup>]) se transformó por medio del método de TSS. Se preparó un cultivo de *E. coli* BL21–Codon Plus (DE3)–RIL© en medio líquido LB Cm15 (15µg/ml de cloranfenicol) y se mantuvo durante toda la noche a 30°C. Después se realizó una dilución 1:50 en 10ml de LB Cm15 y la dilución se incubó a 37°C hasta que se obtuvo una O.D.<sub>600nm</sub> de 0.6. Se preparó 1ml para cada transformación. El cultivo se centrifugó 1' a 13200rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 100µl de TSS frío (Solución de transformación y almacenaje). Se agregó 10ng de los plásmidos pVF9, pVF12, pVF13, pVF16 y pET24 vacío en los cultivos preparados con TSS frío (2 transformaciones por cada plásmido) y se mantuvo en hielo durante 1 hora. Después se aplicó choque térmico a 42°C durante 45" seguido por 3' en hielo. Finalmente se agregaron 600µl de medio SOC y las transformaciones se mantuvieron a 30°C durante 1 hora. Las transformaciones se seleccionaron en medio LB Km20 (20µg/ml de kanamicina) Cm15. Se escogieron dos colonias de cada transformación y se incubaron durante toda la noche en 2ml de medio líquido LB Km20 Cm15. Las cepas de almacenaron en 10% glicerol a -80°C. La descripción de las cepas se muestra en el cuadro 5.

**Cuadro 5  
CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS 17 A 26  
OBTENIDAS POR TSS Y CHOQUE TÉRMICO**

Cepa	Cepa receptora <sup>a</sup>	Plásmido	Característica del plásmido	Resistencia
17	BL21 (DE3) RIL	pVF9	pET24/MA	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
18	BL21 (DE3) RIL	pVF9	pET24/MA	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
19	BL21 (DE3) RIL	pVF12	pET24/CA	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
20	BL21 (DE3) RIL	pVF12	pET24/CA	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
21	BL21 (DE3) RIL	pVF13	pET24/NC	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
22	BL21 (DE3) RIL	pVF13	pET24/NC	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
23	BL21 (DE3) RIL	pVF16	pET24/TM	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
24	BL21 (DE3) RIL	pVF16	pET24/TM	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
25	BL21 (DE3) RIL	pET24	pET24	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>
26	BL21 (DE3) RIL	pET24	pET24	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>

<sup>a</sup> *E. coli* BL21–Codon Plus (DE3)–RIL© Agilent Technologies, Inc. 2009.

## **5. Inducción de sobreexpresión de proteínas virales.**

Las cepas 17, 19, 21, 23 y 25 obtenidas en este trabajo, se indujeron con IPTG para la sobreexpresión de las proteínas recombinantes de interés. Éstas se incubaron toda la noche en medio líquido LB Km20 Cm15. Se realizó de cada cultivo una dilución 1:20 en medio fresco y se incubó a 30°C hasta alcanzar una O.D.<sub>600nm</sub> de 0.5. La inducción se realizó con 1mM de IPTG durante 4 horas. Después de la inducción, los cultivos se ajustaron a una O.D.<sub>600nm</sub> de 1.0 y se centrifugó 1ml de cada uno de estos a 13,200rpm por 30" y se retiró el sobrenadante. Las muestras se resuspendieron en 50µl de amortiguador SDS 2X (Sodio dodecil sulfato) y se calentaron a 95°C durante 5'. Finalmente, se realizó una electroforesis de proteínas bajo condiciones desnaturalizantes en geles de SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se visualizaron mediante la tinción de Coomasie. Los geles se fijaron primero en una solución de acético metanol y luego se tiñeron con solución de Coomasie. Los geles se dejaron durante toda la noche en solución para desteñir (Anexo 1).

# RESULTADOS

## 1. Análisis bioinformático y filogenético del LVPR.

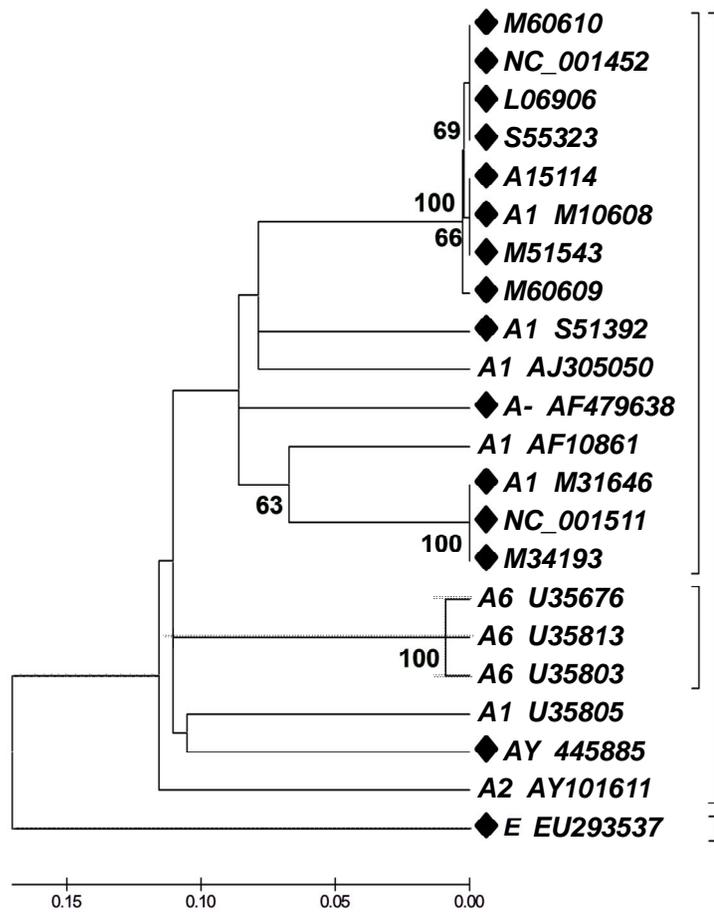
Se obtuvieron dos árboles filogenéticos con las secuencias obtenidas del NCBI (National Center for Biotechnology Information [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). El primer árbol filogenético abarca las secuencias reportadas como genotipo A más las secuencias no asociadas a ningún genotipo obtenidas a partir de muestras de ganado ovino. Los únicos subtipos identificados fueron A1, A2 y A6. La inferencia filogenética establece dentro del genotipo A1 las secuencias A15114, L06906, M34193, M51543, M60609, M60610, NC\_001452, NC\_001511 y S55323 (Figura 28).

El segundo árbol filogenético abarca las secuencias reportadas como genotipo B más dos secuencias no asociadas a ningún genotipo, pero identificadas como Virus de Artritis-Encefalitis Caprina. La inferencia filogenética estableció los genotipos para estas últimas dos secuencias. Se identificaron los dos subtipos (B1 y B2) correspondientes a este genotipo (Figura 29).

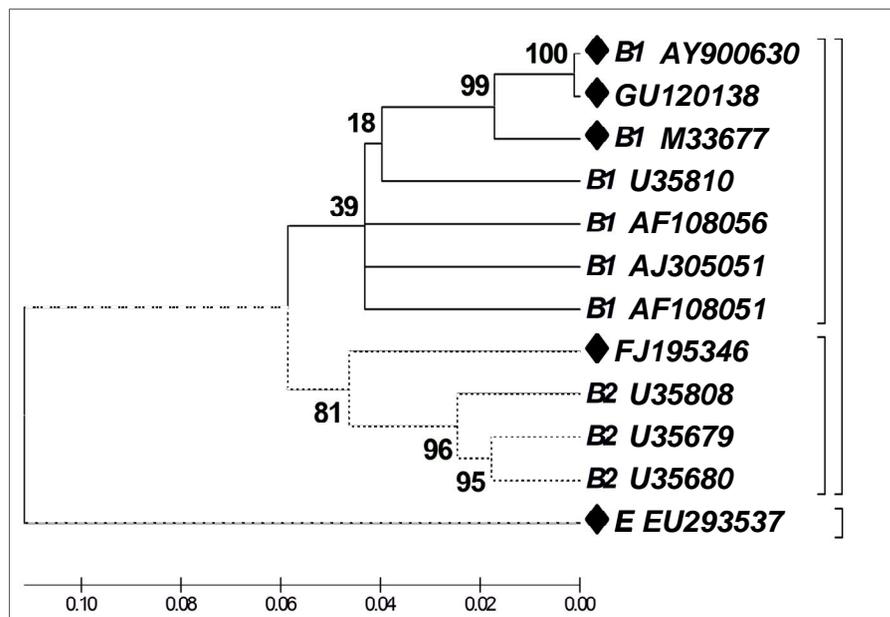
## 2. Diseño de oligonucleótidos.

Se diseñaron 26 oligonucleótidos para la identificación del genotipo y subtipo de LVPR. Los oligonucleótidos se diseñaron para la amplificación de los genotipos y subtipos A, A1, A2, B, B1, B2, E y LVPR general (Cuadros 6 y 7). No se diseñaron oligonucleótidos para el genotipo C debido a que sólo se tiene una secuencia de genoma completo. No se diseñaron oligonucleótidos para el genotipo D porque no se cuenta con secuencias de genoma completo. La secuencia AY445885 no se utilizó en el diseño de los oligonucleótidos en razón de que su análisis filogenético no estableció un genotipo asociado a ésta. El par establecido de oligonucleótidos 10 no tiene secuencia complementaria con el genotipo A2, por lo que sólo detecta genotipo A1. El par establecido de oligonucleótidos 12 delimita una región variable entre los genotipos A1 y A2, se necesita secuenciación de los productos de PCR para detectar a que genotipo pertenecen éstos. El par establecido de oligonucleótidos 13 delimita una región variable entre los genotipos B1 y B2, el fragmento de la secuencia para el genotipo B1 tiene una longitud mayor (70-90pb más). En el análisis "single primer" se detectaron reacciones inespecíficas claras para los oligonucleótidos #8,

#11 (identificación de genotipo E) y #24 (identificación de genotipo A) por lo que se descartó su uso (Figura 30). En la reacción de PCR donde se utilizaron los pares establecidos de oligonucleótidos y el pCAEVneo11 como molde se observó que el par de oligonucleótidos #17 y #18 diseñados para la detección de genotipo A, detecta también el genotipo B1, ya que los oligonucleótidos coinciden alrededor del 95% con la secuencia de este genotipo (gen *pol*, 5499pb y 5876pb respectivamente). Éstos, junto con reacciones adicionales de otros oligonucleótidos, sirven para la detección de LVPR A ó B (Figura 31).



**Figura 28.** Árbol filogenético de todas las secuencias de genoma completo de LVPR A delimitadas al gen *pol* (rombo), más las secuencias incompletas del gen *pol* del LVPR A. Se indica el genotipo y subtipo de LVPR (ya reportado) antes del número de acceso del NCBI. Método Neighbor-Joining, prueba de filogenia Bootstrap con 1000 repeticiones, modelo de evolución Kimura-2 parámetros, intervalos distribuidos proporcionalmente.



**Figura 29.** Árbol filogenético de todas las secuencias de genoma completo de LVPR B delimitadas al gen *pol* (rombo), más las secuencias de referencia del gen *pol* del LVPR B. Método Neighbor-Joining, prueba de filogenia Bootstrap con 1000 repeticiones, modelo de evolución Kimura-2 parámetros, intervalos distribuidos proporcionalmente.

**Cuadro 6**  
**CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LA DETECCIÓN DE GENOTIPO DE LVPR**

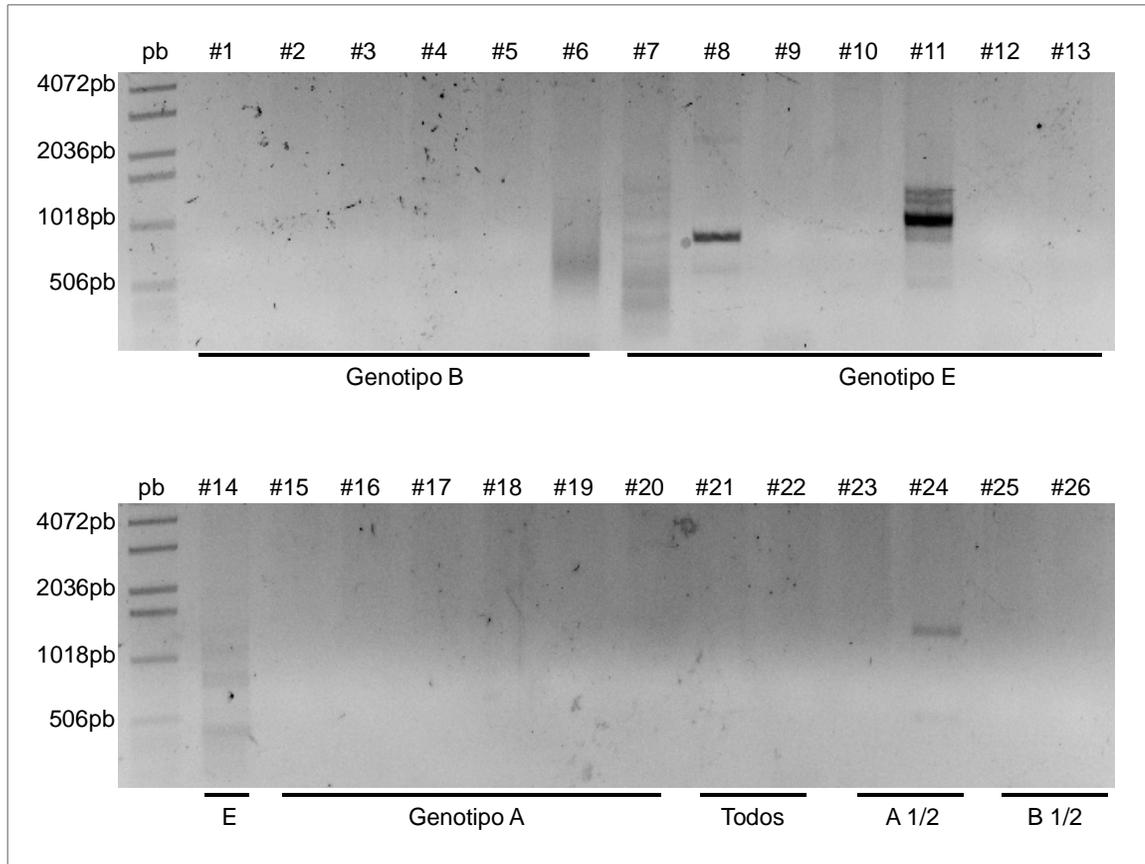
No.	Secuencia	Orientación	Par	Longitud	Estructura secundaria	Dímero	%GC	Tm	Genotipo	Gen
1	CGC CAT GGT GAG TCT AGA TAG	Iniciador	1	21pb	no	No	52.38	61.23	B	<i>gag</i>
2	TCT TTA CTT GTC CAG GTA GTA GCA	Reverso	1	24pb	débil	No	41.67	60.71	B	<i>gag</i>
3	AAG GAA TTC TCC CAA AAA GAG	Iniciador	2	21pb	débil	No	38.1	60.07	B	<i>pol</i>
4	GTC TTC TGC TGC TGT TCT TG	Reverso	2	20pb	no	No	50	60.35	B	<i>pol</i>
5	ACG CGA TTC AGC AGT CTT AC	Iniciador	3	20pb	no	No	50	61.97	B	<i>env</i>
6	GTA CGC CTT TAG CCA CAT GC	Reverso	3	20pb	no	No	55	64.35	B	<i>env</i>
7	GGA GCA AGG TAA GCA GGG AC	Iniciador	4	20pb	no	No	60	64.87	E	LTR 5'
8	AAT AGC TAG CTC ACC ACG GC	Reverso	4	20pb	no	No	55	63.17	E	<i>gag</i>
9	GAA GGC AAT TGT CTT TGG TG	Iniciador	5	20pb	muy débil	No	45	62.04	E	<i>gag</i>
10	TAG GTT CCA CAG CTT TCC AG	Reverso	5	20pb	no	No	50	61.78	E	<i>gag</i>
11	CAG AAA AAG AGG ACA CCC AG	Iniciador	6	20pb	no	No	50	61.24	E	<i>pol</i>
12	TGG AAC CAG AAC TTG TTG TC	Reverso	6	20pb	muy débil	No	45	60.15	E	<i>pol</i>
13	TAG AAG ATT CAC CGA GCC TG	Iniciador	7	20pb	no	No	50	61.90	E	<i>env</i>
14	CTT AGG TTT CAG TCC AGT GAG G	Reverso	7	22pb	muy débil	No	50	61.61	E	<i>env</i>
15	CTG GTT ATT ATC GGG ATT CG	Iniciador	8	20pb	no	No	45	60.68	A	LTR 5'
16	CCC AGT AGG TGT CTC TCT TAC	Reverso	8	21pb	no	No	57.14	62.76	A	LTR 5'
17	TTG GTC TGG GTA GAA ACA AAT TC	Iniciador	9	23pb	muy débil	No	39.13	62.78	A	<i>pol</i>
18	AAA TAT ATC CAT AGG GCT TGT CC	Reverso	9	23pb	no	No	39.13	60.75	A	<i>pol</i>
19	TGT CCA GTC TCT TGC TAA CG	Iniciador	10	20pb	no	No	50	60.62	A1 ó A2	<i>env</i>
20	ACT TGC GGT TAC ATT TGC TG	Reverso	10	20pb	no	No	45	62.59	A1 ó A2	LTR 3'
21	CTA GAT AGA GAC ATG GCG AAG	Iniciador	11	21pb	no	No	52.38	60.71	Todos	<i>gag</i>
22	GGT GCT TCT GTT ACA ACA TAG G	Reverso	11	22pb	muy débil	No	45.45	60.07	Todos	<i>pol</i>
23	TGG TTA TTA TCG GGA TTC GTT AC	Iniciador	12	23pb	no	No	39.13	62.39	A1 ó A2	LTR 5'

**Cuadro 6**  
**CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LA DETECCIÓN DE GENOTIPO DE LVPR**

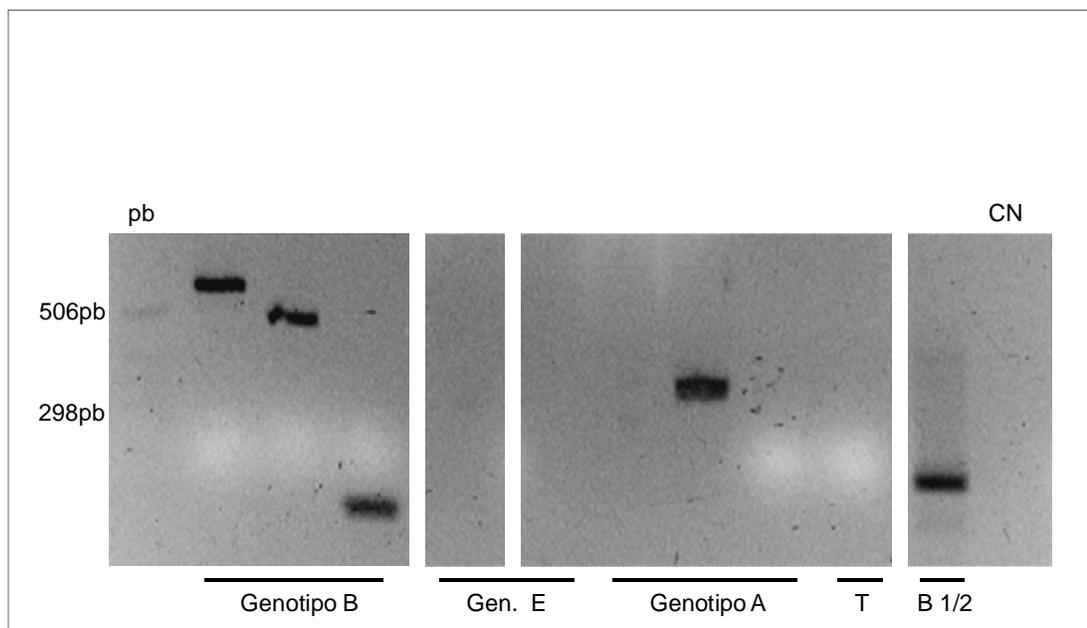
No.	Secuencia	Orientación	Par	Longitud	Estructura secundaria	Dímero	%GC	Tm	Genotipo	Gen
24	TCC CCA GTA GGT GTC TCT CTT AC	Reverso	12	23pb	muy débil	No	52.17	62.32	A1 ó A2	<i>gag</i>
25	GCC AAA TTC CTG TAA ATC ACT TG	Iniciador	13	23pb	no	No	39.13	63.23	B1 ó B2	LTR 3'
26	GCA TGA GCA AGC ATC AGC	Reverso	13	18pb	muy débil	No	55.56	63.50	B1 ó B2	LTR 3'

**Cuadro 7**  
**CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS ORIENTADOS A LA SOBREENPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LVPR B1**

No.	Secuencia	Orientación	Par	Longitud	Estructura secundaria	Dímero	%GC	Tm	Localización en genoma	Proteína
27	GGA TCC GAA GGA GAT ATA CAT ATG GGC GTT GGC TTG GTC ATT ATG	Iniciador	14	45	débil	No	46.67	82.23	7908pb	TM
28	GAG CTC TTG TCC TCT TTA GCC CAT GTC TC	Reverso	14	29	débil	No	51.72	71.91	8843pb	TM
29	GGA TCC GAA GGA GAT ATA CAT ATG GTG AGT CTA GAT AGA GAC	Iniciador	15	42	moderada	No	42.86	73.19	512pb	MA
30	CTC GAG TCT CCC TCC TGC TGC TTG CAC	Reverso	15	27	débil	No	62.96	77.69	970pb	MA
31	GGA TCC GAA GGA GAT ATA CAT ATG AGC TGG AAA GCA GTA GAT TCT	Iniciador	16	45	débil	No	42.22	77.45	971pb	CA
32	CTC GAG GAA CCC TTC TGA TCC CAC ATC	Reverso	16	27	débil	No	55.56	74.54	1606pb	CA
33	GGA TCC GAA GGA GAT ATA CAT ATG AAA ATG CAA TTG TTA GCA CAA	Iniciador	17	45	débil	No	35.56	77.79	1607pb	NC
34	CTC GAG CAT AGG AGG AGC GGA CGG CAC	Reverso	17	27	débil	No	66.67	79.96	1852pb	NC



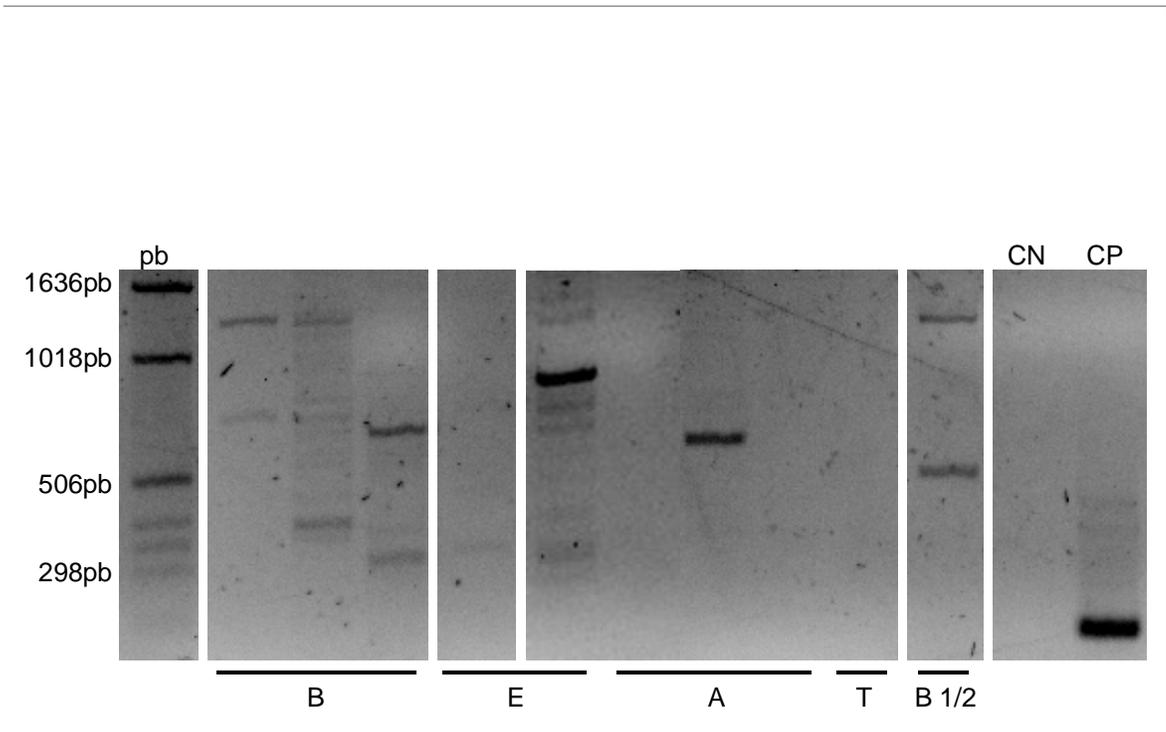
**Figura 30.** Reacción de PCR control con un solo oligonucleótido (análisis “*single primer*”), con ADN genómico de células mononucleares de sangre periférica del caprino seronegativo de la granja particular en la que nunca se han presentado signos clínicos de la enfermedad (Apaseo el Alto, Guanajuato). Se indica el genotipo al que está dirigido cada oligonucleótido (parte inferior). #1 a #26: oligonucleótidos diseñados; Genotipo B: oligonucleótidos dirigidos al genotipo B; Genotipo E: oligonucleótidos dirigidos al genotipo E; Genotipo A: oligonucleótidos dirigidos al genotipo A; Todos: oligonucleótidos dirigidos a todos los genotipos; A 1/2: oligonucleótidos dirigidos a distinguir entre los subtipos 1 y 2 del genotipo A; B 1/2: oligonucleótidos dirigidos a distinguir entre los subtipos 1 y 2 del genotipo B; pb: pares de bases.



**Figura 31.** Reacción de PCR control para cada par establecido de oligonucleótidos, con el plásmido pCAEvneo11 como molde. No se incluyen los pares establecidos de los oligonucleótidos descartados. Se indica la longitud de bases esperada de cada amplificación y el genotipo al que está dirigido cada oligonucleótido (parte inferior). #1 a #26: oligonucleótidos diseñados; NA: no se espera amplificación; In: par establecido de oligonucleótidos con inespecificidad, detectan LVPR A y B; CN: control negativo; CP: control positivo para la reacción; Genotipo B: oligonucleótidos dirigidos al genotipo B; Gen. E: oligonucleótidos dirigidos al genotipo E; Genotipo A: oligonucleótidos dirigidos al genotipo A; T: oligonucleótidos dirigidos a todos los genotipos; B 1/2: oligonucleótidos dirigidos a distinguir entre los subtipos 1 y 2 del genotipo B; pb: pares de bases.

### 3. Determinación del genotipo y subtipo de LVPR mediante PCR.

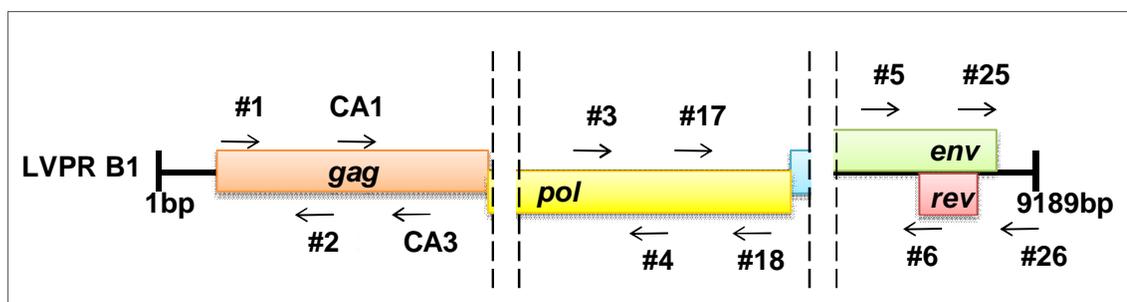
Los pares establecidos de oligonucleótidos diseñados presentaron inespecificidad en la reacción de PCR en presencia de ADN genómico de PMBC de los caprinos evaluados. Los productos inespecíficos generados por los oligonucleótidos #5 y #6 y los oligonucleótidos #13 y #14 son diferentes a los observados en el análisis "single primer" (Figura 32.). Debido a estas inespecificidades se determinó utilizar pares de oligonucleótidos que delimitan regiones de LVPR B1 de 1kb aproximadamente (Cuadro 8, Figura 33.).



**Figura 32.** Reacción de PCR diagnóstico para cada par establecido de oligonucleótidos, con ADN genómico de PMBC del caprino número 4. No se incluyen los pares establecidos de los oligonucleótidos descartados. Se indica la longitud de bases esperada de cada amplificación y el genotipo al que está dirigido cada oligonucleótido (parte inferior). Las reacciones son representativas de las amplificaciones obtenidas con las demás muestras de ADN caprino. #1 a #26: oligonucleótidos diseñados; NA: no se espera amplificación; In: par establecido de oligonucleótidos con inespecificidad, detectan LVPR A y B; CN: control negativo para la reacción; CP: control positivo para la reacción; B: oligonucleótidos dirigidos al genotipo B; E: oligonucleótidos dirigidos al genotipo E; A: oligonucleótidos dirigidos al genotipo A; T: oligonucleótidos dirigidos a todos los genotipos; B 1/2: oligonucleótidos dirigidos a distinguir entre los subtipos 1 y 2 del genotipo B; pb: pares de bases.

**Cuadro 8**  
**LONGITUD ESPERADA DE LOS FRAGMENTOS OBTENIDOS CON LOS PARES DE OLIGONUCLEÓTIDOS ORIENTADOS AL LVPR B1**

Pares establecidos (LVPR B1 ó pCAEVneo11)	Fragmentos (LVPR B1 ó pCAEVneo11)	Pares nuevos	Fragmentos (LVPR B1 ó pCAEVneo11)
CA1 / CA3	287pb	#1 / CA3	1134pb
#1/#2	588pb		
#3/#4	488pb	#3/#18	986pb
#17/#18	378pb		
#5/#6	120pb	#5/#26	1071pb
#25/#26	194pb		

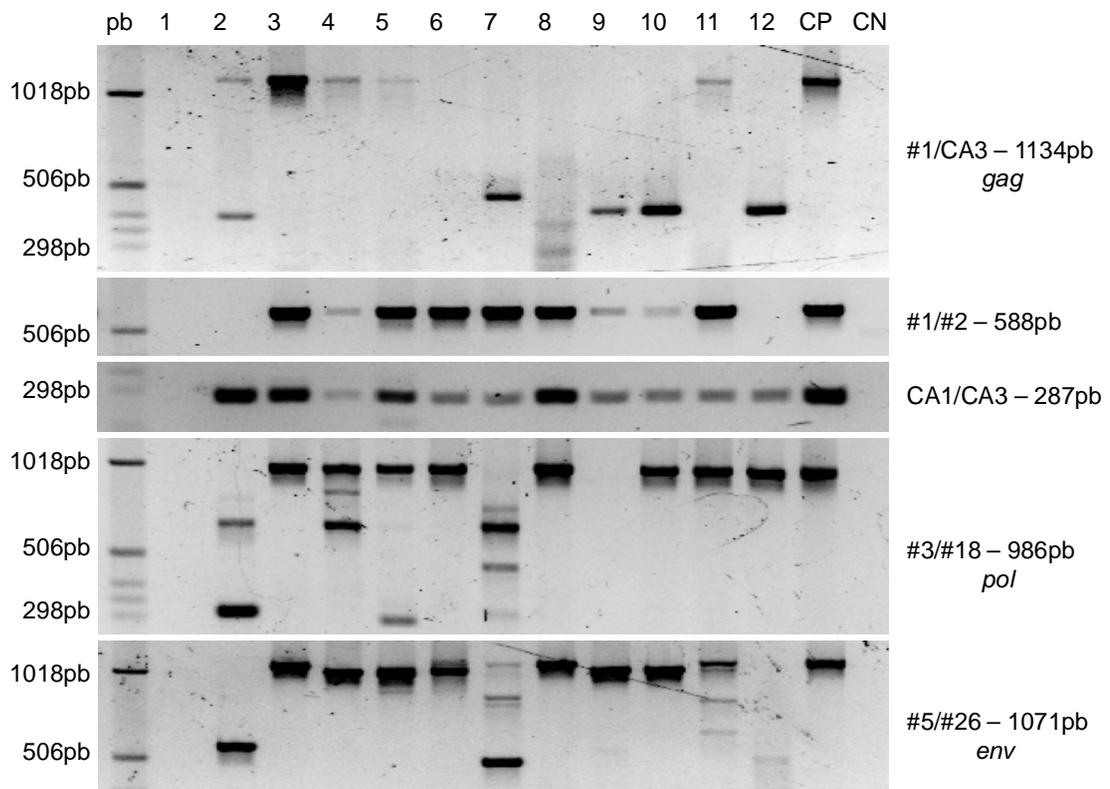


**Figura 33.** Localización de los oligonucleótidos diseñados orientados a la detección del LVPR B1 en el mapa genómico parcial para dicho tipo viral. #1 a #26: oligonucleótidos diseñados; CA1, CA3: oligonucleótidos de referencia (Reddy *et al*, 1993).

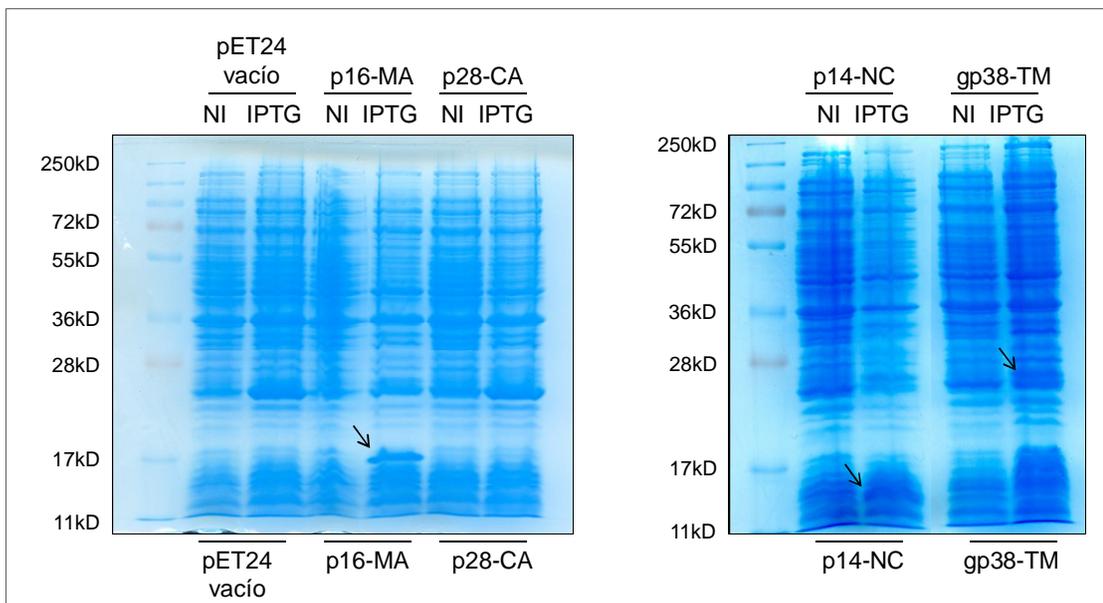
Los pares nuevos de oligonucleótidos orientados a la detección de LVPR B1 incluyen regiones de 1kb de longitud en cada uno de los 3 genes principales de LVPR (*gag*, *pol*, *env*) (Figura 34). Los productos generados con los pares #3/#18 (*pol*) y #5/#26 (*env*) son definidos. El par #5/#26 (*env*) genera productos de diferentes tamaños para cada muestra de ADN evaluado. Para el caso del par #1/CA3 (*gag*) no hay amplificación en todas las muestras, sin embargo, no es el caso para los pares establecidos internos de oligonucleótidos #1/#2 y CA1/CA3.

#### 4. Inducción de sobreexpresión de proteínas virales.

Se visualizaron en geles acrilamida, extractos solubles de proteínas totales a partir de las cepas de *E. coli* BL21–Codon Plus (DE3)–RIL© con los plásmidos para sobreexpresar las proteínas virales recombinantes de LVPR B1. Los geles muestran bandas con el peso molecular esperado para las proteínas p16-MA y p14-NC. Para el caso de la proteína gp38-TM se observa una banda de alrededor de 27kD. En el caso de la proteína p28-CA, no se observan diferencias en las bandas expresadas con respecto a la cepa control (Figura 35). Las bandas que aparecen en los geles con el peso molecular esperado, no necesariamente indican que son producto de la sobreexpresión de la proteína de interés, pero sugiere su presencia.



**Figura 34.** Reacción de PCR dirigida a la detección del LVPR B1. Se indica la longitud de bases esperada de cada amplificación. 1 a 12: caprinos evaluados; #1 a #26: oligonucleótidos diseñados; CA1, CA3: oligonucleótidos de referencia (Reddy *et al*, 1993); CN: control negativo para la reacción; pb: pares de bases.



**Figura 35.** Electroforesis de extractos totales de proteínas de las cepas transformadas de *E. coli* BL21–Codon Plus (DE3)–RIL© antes y después de su inducción con IPTG, bajo condiciones desnaturalizantes de SDS-PAGE 12%. Se indican las proteínas recombinantes de cada cepa y el tamaño en kD de cada una de ellas. Se utilizó un control de la cepa *E. coli* BL21–Codon Plus (DE3)–RIL© transformada con el plásmido pET24 vacío. MPM: marcador de peso molecular; NI: previo a la inducción con IPTG; IPTG: después de la inducción con IPTG.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados de las amplificaciones obtenidas en el PCR diagnóstico permitieron la detección de LVPR B1 y el diseño de herramientas moleculares orientadas a la sobreexpresión de proteínas pertenecientes a este genotipo.

Con los oligonucleótidos diseñados, se pudo determinar que el virus presente en los animales evaluados pertenece al LVPR B1. Aunque se observaron amplificaciones inespecíficas en las reacciones de PCR, no se detectó ni LVPR A ni LVPR E. Esto se sustenta con los reportes de que la enfermedad ingresó a partir de la importación de ganado caprino de los Estados Unidos (Torres-Acosta *et al*, 2003; Test *et al*, 1999; Leyva *et al*, 1998; Nazara *et al*, 1985a; Nazara *et al*, 1985b; Nazara *et al*, 1983), donde se presentan los genotipos A (ovinos) y B (caprinos). Aunque existe infección cruzada entre los genotipos A y B, en México, la ausencia de reportes de signos clínicos relacionados con LVPR en ovinos, sugiere que los reportes de la enfermedad son del LVPR B (OIE, 2011a; OIE, 2011b; SAGARPA, 2011c). Las variaciones en la longitud de los fragmentos amplificados con el par de oligonucleótidos #5/#26 indica la posibilidad de que se generó algún rearrreglo en esta región. Esto concuerda con los reportes de que esta secuencia presenta una tasa de mutación alta en comparación con las regiones conservadas *gag* y *pol* (De Andrés *et al*, 2005; Rauddi, 2005; Castro *et al*, 1999; Wain-Hobson, 1996). Las reacciones inespecíficas observadas al probar los pares establecidos de oligonucleótidos y el par establecido #1/CA3 con muestras de ADN genómico obtenidas de PMBC de caprinos, pueden deberse simplemente a que estos oligonucleótidos están uniéndose a secuencias con cierta homología. Como no se conoce la secuencia completa del genoma caprino, no se puede hacer un análisis bioinformático y determinar si los oligonucleótidos diseñados son complementarios a alguna secuencia dentro del genoma caprino. Otra posibilidad es que hubiera más de un genoma viral insertado en el genoma del caprino y la distribución de los genomas virales podrían generar también lo que se define como inespecificidad (Gendelman *et al*, 1985). La variación en el tamaño de los fragmentos amplificados y las reacciones inespecíficas observadas en el PCR, indican la necesidad de secuenciar los productos para identificar el origen de los resultados observados.

La obtención de cepas de *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes de LVPR B1 es el primer paso en el desarrollo de una herramienta de diagnóstico inmunológico. La

sobreexpresión de las proteínas p16-MA, p14-NC y gp38-TM podría facilitar el diseño de alguna prueba diagnóstica basada en la utilización de antígenos no inmunodominantes. Sin embargo, es necesario realizar la purificación de las proteínas y evaluar su antigenicidad. Para la proteína gp38-TM, donde la banda de sobreexpresión se observa con un peso molecular distinto, la purificación y el análisis de la proteína ayudarán a saber si el peso inespecífico detectado se debe a un producto de degradación. En el caso de la proteína p28-CA es necesario realizar la purificación para determinar si la cepa de *E. coli* está expresando la proteína, y si este es el caso, es probable que la baja cantidad en su obtención se deba a que se está degradando.

El análisis bioinformático y filogenético es indispensable para identificar variaciones entre los tipos virales conocidos y poder diseñar oligonucleótidos específicos que puedan identificar el genotipo y subtipo de las muestras a evaluarse. Los alineamientos obtenidos y la filogenia establecida, son una herramienta para la identificación, de inclusiones o exclusiones para los genotipos o subtipos a identificar; sin embargo, se necesitan realizar diversas reacciones de PCR complementarias para poder definir el genotipo identificado, debido a que no han sido reportadas secuencias completas o que abarquen todos los genotipos y subtipos reportados para los LVPR. La falta de secuencias reportadas para el genotipo A dificulta el diseño de oligonucleótidos específicos por subtipo. Los oligonucleótidos diseñados en este trabajo, orientados a la detección del genotipo A son la base para la identificación de la cepa dentro de territorio mexicano. Dicha identificación podría ser determinada si las investigaciones se enfocaran a la detección de este genotipo de LVPR, realizando primero secuenciación de los productos, análisis bioinformáticos específicos y buscando ovinos y caprinos pertenecientes al mismo rebaño (rebaños mixtos) (Kaba *et al*, 2009; Kuzmak *et al*, 2007; Pisoni *et al*, 2007; Pisoni *et al*, 2005; Blacklaws *et al*, 2004; Shah *et al*, 2004a; Shah *et al*, 2004b; Castro *et al*, 1999; Test *et al*, 1999; Pasick, 1998).

La detección del LVPR B1 en las muestras evaluadas, es una herramienta importante para enfocar la detección hacia LVPR B en granjas particulares de producción lechera intensiva del país y confirmar con esto el genotipo presente en México. Este análisis debe incluir la secuenciación de los productos de PCR para confirmar el subtipo o encontrar un subtipo distinto a los reportados en la literatura. También plantea la necesidad de comenzar el análisis inmunológico y molecular en los rebaños ovinos del país, para determinar si estos pueden funcionar como fuente de infección importante y si afectan de manera relevante los programas de control de la enfermedad. Aunque para la Artritis-Encefalitis Caprina se considera como determinante el diagnóstico combinado por PCR y serología, es importante desarrollar herramientas de diagnóstico que sean prácticas y fáciles de utilizar en campo. Es también de gran importancia utilizar herramientas que estén enfocadas a determinar el genotipo y subtipo particular presentes en la región a evaluar.

## **PROSPECTIVA**

La sobreexpresión de proteínas virales recombinantes codificadas de productos amplificados obtenidos directamente de aislados clínicos de animales mexicanos (ovinos y caprinos) es de suma importancia para ampliar la prueba serológica. Estas proteínas recombinantes servirían para el desarrollo de técnicas diagnósticas serológicas de laboratorio, que al perfeccionarse darían paso al establecimiento de una prueba de campo. Con la prueba de campo producida, se obtendrían resultados inmediatos que repercutirían en las decisiones diarias sobre el manejo de los animales dentro de los programas de control de la enfermedad causada por Lentivirus de Pequeños Rumiantes.

## REFERENCIAS

- Blacklaws BA, Barriatua E, Torsteindottir S, Watt NJ, De Andres D, Klein D, *et al.* 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 101(3):199-208.
- Briones MCMC. 2008. Construcción de un vector para clonar productos de PCR. (tesis de maestría) S.L.P., México: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Calvin, NM; Hanawalt, PC. 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.* 170:2796-2801.
- Castro RS, Greenland T, Leite RC, Gouveia AMG, Mornex JF, Cordier G. 1999. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *J. Gen Virol.* 80:1583-1589.
- Clavijo A, Thorsen J. 1995. Bacterial expression of the caprine arthritis-encephalitis virus gag and env proteins and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res.* 56(7):841-848.
- Crane SE, Buzy J, Clements JE. 1991. Identification of cell membrane proteins that bind visna virus. *J. Virol.* 65(11):6137-6143.
- Crespo H, Reina R, Glaria I, Ramírez H, De Andrés X, Jáuregui P, Luján L, Martínez-Pomares L, Amorena B, De Andrés D. 2011. Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in visna/maedi virus infection. *Veterinary Research.* 42:28.
- Cuéllar-Ordaz JA. 2000. Reglamentación en materia sanitaria en caprinos de México. *Memorias de la XV Reunión Nacional sobre Caprinocultura; México. Mérida.* 24-35.
- Cunha AKC, Soares R, Da Silva MFT. 2001. Lentivirus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisao e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.*21(3):87-97.
- De Andrés D, Klein D, Watt NJ, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Blacklaws BA, Harkiss GD. 2005. Diagnostic test for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol.* 107:49-62.
- East NE, Rave SD, Dahlberg JE, Theilen GH, Pederson NC. 1993. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Rumin. Res.* 10:251-262
- Gendelman HE, Narayan O, Molineaux S, Clements JE, Ghotbi Z. 1985. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc Natl Acad Sci.* 82:7086-7090.

- Glaria I, Reina R, Crespo H, De Andrés X, Ramírez H, Biescas E *et al.* 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet. Microbiol.* 138:156-162.
- Greenwood PL. 1995. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.* 22:71-87.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Harmache A, Bouyac M, Audoly G, Hiebolt C, Peveri P, Vigne R, Suzan M. 1995a. The vif gene is essential for efficient replication of Caprine Arthritis Encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J Virol*, 69(6):3247-3257.
- Harmache A, Vitu C, Russo P, Bouyac M, Hielbot C, Peveri P *et al.* 1995b. The Caprine Arthritis Encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. *J Virol.* 69(9):5445-5454.
- Herrmann LM, Cheevers WP, McGuire T, Scott DA, Hutton MM, Gavin WG, *et al.* 2003. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(2):267-271
- Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). 2003. [homepage on the Internet] México: Eventos y Noticias del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica [updated 2003; cited 2007 Dic 17] Salazar-Olivo L, Rangel C, Flores N, López-Revilla R. La artritis-encefalitis caprina: amenaza la caprinocultura potosina. [about 4 screens] Available from: [http://www.ipicyt.edu.mx/eipicyt/eventosynoticias/pulso\\_diciembre\\_03.pdf](http://www.ipicyt.edu.mx/eipicyt/eventosynoticias/pulso_diciembre_03.pdf)
- Kaba J, Rola M, Materniak M, Kuźmak J, Nowicki M. 2009. Isolation and characterization of caprine arthritis encephalitis virus in goats from Poland. *Pol J Vet Sci* 12(2):183-8.
- Knowles DP, Evermann JF, Shropshire C, VanderSchalie J, Bradway D, Gezon HM, Cheevers WP. 1994. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibodies to caprine arthritis encephalitis. *J Clin Microbiol* 32(1):243-245.
- Kuzmak J, Rola M, Gallay K, Chebloune Y. 2007. Molecular characterization of lentiviruses from goats from Poland based on gag gene sequence analysis. *CIMID* 30:211-223.
- Lara SH, Birgel Jr EH, Gregory L, Birgel EH. 2005. Clinical features of caprine arthritis-encephalitis infections. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57(6):737-740.
- Lara SH, Birgel Jr. EH, Reischak D, Moojen AC, Gregory L, Oliveira JFC, *et al.* 2002. Identificação imuno-sorológica de anticorpos anti-vírus da artrite-encefalite dos caprinos:

- comparação das técnicas de imunodifusão em gel de ágar, ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta. *Arq. Inst. Biol.* 69(4):1-5.
- Leyva GVH, Martínez RHA, González RMG, Cornejo CMA, Rosales ME, Garrido FG, *et al.* 1998. Identificación del virus de la artritis-encefalitis caprina mediante el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural, en tejidos de cabras seropositivas en México. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 40:33-38.
  - Lima PP, Rocha MA, Stancek D, Gouveia AMG, Oliveira GDR. 2004. Virus da artrite encefalite caprina: isolamento e caracterizacao de parte do gene gag. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Brasil.* 56(2):135-142.
  - Martínez HA, Ramírez H, Tórtora J, Aguilar A, Garrido GI, Montaraz JA. 2005. Efecto del virus de la artritis-encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. *Vet. Méx.* 36(2):159-176.
  - Martínez-Navalón B, Peris-Ribera C, Roche-Julian ML, Caballero-Galván C. 2001. Efecto del virus de la artritis encefalitis caprina sobre la producción y composición de la leche en cabras murciano-granadinas. Available from: [http://www.capraispana.com/enfermedades/cae/efecto\\_artritis\\_encefalitis.htm](http://www.capraispana.com/enfermedades/cae/efecto_artritis_encefalitis.htm)
  - Nazara SJ, Trigo FJ, Suberbie E, Madrigal V. 1983. Informe preliminar sobre la seroprevalencia de la artritis-encefalitis caprina en México. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México; 1983; México, D.F. Centro Médico Nacional.* Pág. 550-552.
  - Nazara SJ, Trigo FJ, Suberbie E, Madrigal V. 1985a. Estudio clínico patológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Vet. Méx.* 16(2):91-100.
  - Nazara SJ, Trigo FJ, Suberbie E, Madrigal V. 1985b. Estudio serológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Tec Pec. Méx.* 48:98-101.
  - Nord K, Rimstad E, Storset AK, Loken T. 1998. Prevalence of antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus in goat herds in Norway. *Small Rumin. Res.* 28:115-121.
  - Organisation Mondiale de la Santé Animale [homepage on the Internet]. Paris: OIE 2011a. WAHID Interface. Información Zoonosológica [about 4 screens] Available from: <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>
  - Organisation Mondiale de la Santé Animale [homepage on the Internet]. Paris: OIE 2011b. Handistatus II: Situación zoonosológica plurianual de México. [about 5 screens] Available from: <http://web.oie.int/hs2/report.asp?lang=en>
  - Organisation Mondiale de la Santé Animale [homepage on the Internet]. Paris: OIE 2004. Normas Internacionales. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (mamíferos, aves y abejas). 5a ed. Capítulo 2.7.3./4. Versión web. [about 4 screens] Available from: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

- Özyörük F, Cheevers WP, Hullinger GA., McGuire T, Hutton M, Knowles DP. 2001. Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of the caprine arthritis-encephalitis virus: potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(1):44-51
- Pasick J. 1998. Use of a recombinant maedi-visna virus protein ELISA for the serologic diagnostic of lentivirus infections in small ruminants. 1998. *Can. J. Vet. Res.* 62:307-310.
- Pérez SA. 2005. Identificación de anticuerpos contra proteínas de lentivirus en machos ovinos por las técnicas de inmunoelectrotransferencia (western blot) y ELISA indirecta. (tesis de licenciatura) Estado de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Peterhans E, Greenland T, Badiola J Harkiss G, Bertoni G, Amorena B, *et al.* 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (LVPRs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 35:257-274.
- Pisoni G, Bertoni G, Pricelli M, Maccalli M, Moroni P. 2007. Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *J. Virol.* 81(10):4948-4955.
- Pisoni G, Quasso A, Moroni P. 2005. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virol.* 339:147-152.
- Rauddi ML. 2005 Capacidad de unión al ARN genómico viral de mutantes de la proteína nucleocápside del virus de inmunodeficiencia de felinos (tesina de grado). Universidad de Belgrano [homepage on the Internet] Argentina: Publicaciones de la Universidad de Belgrano, Argentina. [updated 2005; cited 2009 Dic 18] Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 2005. [about 3 screens] Available from: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones/default.htm>.
- Reddy PG, Sapp WJ, Heneine W. 1993. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31(11):3042-3043
- Reina R, Grego E, Bertolotti L, De Meneghi D, Rosati S. 2009a. Genome analysis of small-ruminant lentivirus genotype E: a caprine lentivirus with natural deletions of the dUTPase subunit, vpr-like accessory gene, and 70-base-pair repeat of the U3 region. *J. Virol.* 83(2):1152:1155.
- Reina R, Grego E, Profiti M, Galaria I, Robino P, Quasso A *et al.* 2009b. Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Vet. Microbiol.* 138:251-257.
- Reséndiz-Martínez R, Barreto-Argilagos G, Campal-Espinosa A, Cornejo-Flores EK, Villarreal-EspinoBarros OA, Aguilar-Setién A. 2002. Estudio clínico y serológico de la artritis encefalitis caprina en el estado de Puebla, México. *Rev. Prod. Anim.* 14(2):53-55
- Rimstad E, East N, DeRock E, Higgins J, Pedersen NC. 1994. Detection of antibodies to caprine arthritis encephalitis using recombinant gag proteins. *Arch Virol.* 134:345-356.

- Rowe JD, East NE. 1997. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13(1):35-53.
- Saman E, Van Eynde G, Lujan L, Extramiana B, Harkiss G, Tolari F, *et al.* 1999. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(5):734-740.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [homepage on the Internet] México: SAGARPA 2011a. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Acuerdos en materia de Sanidad Animal. [about 4 screens] Available from: <http://www.senasica.gob.mx>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [homepage on the Internet] México: SAGARPA 2011b. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Normas Oficiales Mexicanas en materia de Sanidad Animal. [about 4 screens] Available from: <http://www.senasica.gob.mx>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [homepage on the Internet] México: SAGARPA 2011c. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Vigilancia Epidemiológica. Informes anuales de la Situación Zoonositaria de México respecto a las enfermedades de la lista de la OIE. [about 4 screens] Available from: <http://www.senasica.gob.mx>
- Shah C, Böni J, Huder JB, Vogt HR, Mülherr J, Zanoni R *et al.* 2004a. 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* 319:12–26
- Shah C, Huder JB, Böni J, Schönmann M, Mülherr J, Lutz H, *et al.* 2004b. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J. Virol.* 78(14):7518-7522.
- Simard C, Kibenge MT, Singh P, Dixon P. 2001. Simple and Rapid Method for Production of Whole-Virus Antigen for Serodiagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(2):352-356.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Travassos C, Benoit C, Valas S, Da Silva A, Perrin G. 1999. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rumin Res* 32:101-106.
- Tesoro EC, Hernández RG, Martínez AR, Ramírez HA, Trujillo MEO, Kretschmer RS, *et al.* 2003. Detección de anticuerpos contra artritis-encefalitis caprina (AEC) mediante inmunoelectrotransferencia. *Vet. Méx.* 34(2):119-127.

- Test MD, De la Concha-Bermejillo A, Espinosa LEL, Rubio EL, Setién AA. 1999. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can. J. Vet. Res.* 63:212-215.
- Torres-Acosta FJ, Gutiérrez-Ruiz EJ, Butler V, Schmidt A, Evans J, Babington J, *et al.* 2003. Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goats herds of Yucatan, Mexico. *Small Rumin. Res.* 49(2):207-211.
- Torres-Vázquez JA, Vázquez-Flores F, Montaldo HH, Ulloa-Arvizu R, Valencia-Posadas M, Gayosso-Vázquez A, Alonso-Morales RA. 2008. Genetic polymorphism of the *cs1*-casein locus in five populations of goats from Mexico. Available from: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/issue3/full/11/>
- Vázquez-Franco NC. 2008. Estudio sobre la seroprevalencia de la Artritis-Encefalitis Caprina en sistemas lecheros intensivos en la region del Altiplano Mexicano. (tesis de licenciatura) D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wain-Hobson S. 1996. Running the gamut of retroviral variation. *Trends Microbiol.* 4(4):135-41.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Zanoni RG, Nauta IM, Kuhnert P, Pauli U, Pohl B, Peterhans E. 1992. Genomic heterogeneity of SRLV detected by PCR. *Vet Microbiol.* 33:341-351.
- Zanoni RG, Nauta IM, Pauli U, Peterhans E. 1991. Expression in *escherichia coli* and sequencing of the coding region for the capsid protein of dutch maedi-visna virus strain ZZV 1050: application of recombinant protein for the detection of caprine and ovine lentiviruses. *J. Clin. Microbiol.* 29(7):1290-1294.

## ANEXO 1. MEDIOS Y SOLUCIONES

### Medio Líquido LB

Triptona	10gr
Extracto de levadura	5gr
NaCl	5gr
Aforar a 1000ml	

### Medio Sólido LB

Triptona	10gr
Extracto de levadura	5gr
NaCl	5gr
Agar	15gr
Aforar a 1000ml	

### Medio SOC

SOB	10ml
MgSO <sub>4</sub>	100µl
MgCl <sub>2</sub>	100µl
Glucosa 40%	100µl

### Medio SOB

Extracto de levadura	5gr
Triptófano	20gr
NaCl 5M	2ml
KCl <sub>2</sub> 1M	2.5ml
Aforar a 1000ml	

### Amortiguador TSS

Polietilenglicol	10%
Dimetil sulfóxido	5%
MgCl <sub>2</sub>	20mM

### 4X SDS/fosfato, pH 7.2

0.4M fosfato de sodio / 0.4% SDS

### Gel concentrador (3.9%)

Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%	0.65ml
4X Tris-Cl/SDS pH6.8	1.25ml
Agua destilada	3.05ml
Persulfato de amonio 10% (w/v)	0.025ml
TEMED	0.005ml

### Gel separador (12%)

Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%	4ml
4X Tris-Cl/SDS pH6.8	2.5ml
Agua destilada	3.5ml
Persulfato de amonio 10% (w/v)	0.033ml
TEMED	0.006ml

### Amortiguador de corrida SDS/fosfato

4X SDS/fosfato, pH 7.2	500ml
Agua destilada	2000ml

### Amortiguador de muestra SDS/fosfato

4X SDS/fosfato, pH 7.2	0.5ml
SDS	0.2gr
Azul de bromofenol	0.1mg
DTT	0.31gr
Glicerol	2ml
Aforar a 10ml	

### Solución de tinción (azul de Coomassie)

Metanol	50%
Azul brillante de Coomassie	0.05%
Ácido acético	10%
Agua	40%

### Solución fijadora

Metanol	50%
Ácido acético	10%
Agua	40%

### Solución decolorante

Metanol	5%
Ácido acético	7%
Agua	88%