

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS
INMUNODOMINANTES DE HERPESVIRUS CAPRINO TIPO I
MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT EN DOS DIMENSIONES.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ARACELI CÁRDENAS NARES

Asesores:

Dra. Laura Cobos Marín

Dr. Alejandro Benítez Guzmán

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi familia, principalmente a mis padres; Rosa María Nares Joya y Antonio Cárdenas Ramírez por brindarme y mostrarme el amor incondicional a lo largo de mi existencia, los mejores consejos y anécdotas indudablemente vienen de ustedes así como la sabiduría que me han transmitido, la persona que soy hasta ahora es debido principalmente a ustedes dos, estoy infinitamente agradecida por los padres que tengo y sin duda son más de lo que pude pedir en esta vida, LOS AMO mucho. A mis hermanas Rosaura y Andrea que a pesar de nuestras diferencias han estado a mi lado en momentos difíciles no solo escolares, no se desharán de mi tan fácil canijas. A dos principales compañeras de vida María de Jesús Cárdenas y Andrea Alanís que han sido parte importante de mi vida desde tiempos remotos agradezco primordialmente sus muestras de amor, alegría, paciencia, comprensión y consejos que han logrado brindarme.

A mis amigos, por su sincera e incomparable amistad, soy muy afortunada por tenerlos a todos ustedes con migo, los amo incondicionalmente a todos ustedes.

De la carrera; Berenice, Paola, Nayeli, Dan, Naz, Fabi y Abi por las alegrías y desvelos que hemos pasado para llegar a este punto, ¡son increíbles! amigos inigualables de la vida sin duda, gracias por sus consejos y buena vibra que me ofrecen a cada momento, el universo conspira con nosotros.

Al club de locura creciente cuyo nombre no puedo nombrar; Areli, Circe, Muñoz, Nat, Cloé, Paula, Mar, Conchi, Mel, Nuch, son una locura eterna e irrepetible. Que derroche de felicidad tenerlas, podernos encontrar y reír hasta llorar, viajar, bailar hasta el amanecer y hacer pura magia a cada paso, ¡están bien padres! Cabe señalar que el punto número 1, 2 y 3 nos llevan a lo mismo...

A mis amigos del laboratorio de Virología y Proteómica; Eri, Nao, José, Pablo, Glu, Alicia, Lau, Ari, Lalo, Héctor, Aldo, por ser mi principal apoyo durante este proceso no sólo de tipo académico, si no también las risas y entendiendo juntos lo que era en realidad hacer una tesis; las emociones de los experimentos, las anécdotas interlaboratoriales, y las frustraciones para lograr cada paso de algo que creía interminable, todos fueron parte importante de que lograra llegar a este punto, gracias infinitas por el ánimo en los momentos de debilidad. ¡Suerte! ¡Suerte! ¡Suerte! En lo que cada uno esté haciendo y quiera lograr.

No fue fácil, pero aquí seguimos en la marcha, gracias a todos por su excelente energía dedicada, siempre iré de vuelta <3.

ALOHA.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser mi segundo hogar y permitirme cursar mis estudios de licenciatura.

A la Dra. Laura Cobos Marín por permitirme pertenecer al departamento de Microbiología e Inmunología en primera instancia para luego aceptarme en su equipo de trabajo, así como también por transmitirme su pasión por la ciencia y la enseñanza principalmente en la inmunología, también por su conocimiento en el área que nunca dudó en transmitirme, su experiencia y apoyo durante este trabajo.

Al Dr. Alejandro Benítez Guzmán por dedicarme su tiempo para mi formación en el área de la ciencia, y el que me permitiera aprender de usted al ver más allá de lo que se podía esperar en cada parte de este proceso, por su paciencia, dedicación y compromiso que me ofreció sin nada a cambio. Agradezco su sinceridad y consejos que me brindó en momentos cruciales y que fueron indudablemente de gran ayuda para lograr este trabajo y a su vez lidiar con la frustración del momento.

Así como también a la Dra. Liliana Valdez y a la Dra. Rosa E. Sarmiento por permitirme ser parte del laboratorio de Virología y poder desarrollar mi trabajo de manera exitosa, de la misma manera por los conocimientos que obtuve de ustedes en esta área y su siempre disposición de aclarar mis dudas.

A Armando y al Sr. Mario, que sin ustedes no hubiese podido completar esta tarea, agradezco su esfuerzo y trabajo arduo como parte del laboratorio.

Al laboratorio de Proteómica de la FMVZ, por su colaboración y acercamiento en este trabajo, principalmente a Aldo Morales por permitirme aprender y compartir su conocimiento y experiencia.

A mi jurado: Dra. Rosa E. Sarmiento Silva, Dra. Erika G. Hernández Rojas, Dr. José A. Cano Buendía y al Dr. Andrés E. Ducoing Watty, por enriquecer esta tesis con sus valiosos comentarios.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Antecedentes	4
1.2 Características del Herpes Virus Caprino tipo 1 (CpHV-1).....	6
1.3 Estructura	7
1.4 Ciclo de replicación viral	9
1.5 Latencia.....	12
1.6 Patogenia.....	14
1.7 Signos clínicos y lesiones observables a la necropsia.....	16
1.8 Respuesta inmune y evasión	17
1.9 Relación con otros alfa herpes virus	20
1.10 Diagnóstico	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL	24
4.1 Objetivos particulares.....	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1 REPLICACIÓN VIRAL.....	26
5.1.1 Elaboración del inóculo	26
5.1.2 Características e inoculación en embrión de pollo.	26
5.1.3 Replicación de CpHV-1 en cultivo celular.	27
5.1.4 Cosecha del virus a partir del cultivo celular.	27
5.2 PRECIPITACIÓN DE CpHV-1	27
5.2.1 Polietilenglicol (PEG)	27
5.3.1 Gel SDS-PAGE 1D.....	28
5.3.2 Western Blot (WB)	29
5.4 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES	30
5.4.2 Isoelectroenfoque	31

5.4.3 Electroforesis.....	31
5.4.4 Western Blot	31
5.5 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES	32
5.6 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES.....	32
5.6.1 Inmunoprecipitación	33
5.6.2 Ultracentrifugación.	34
6. RESULTADOS	35
6.1 AISLAMIENTO Y REPLICACIÓN VIRAL	35
6.1.1 Embrión de pollo.....	35
6.1.2 Cultivo celular.....	36
.....	37
6.2 PRESENCIA DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES.....	38
6.2.1 Precipitación de CpHV-1con PEG.	38
6.3 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES	40
6.3.1 Caracterización de proteínas inmunodominantes de CpHV-1.....	40
6.3.2 Determinación del peso molecular de las proteínas inmunodominantes.....	42
6.4 CONCENTRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES OBTENIDAS	43
6.4.1 Inmunoprecipitación	43
6.4.2 Ultracentrifugación	46
6.5 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS REPORTADAS A PARTIR DEL MÉTODO DE ESPECTOFOTOMETRÍA EN MASA.	47
7. DISCUSIÓN	50
8. CONCLUSIONES	57
9. PROSPECTIVAS	58
10. REFERENCIAS	59
11. ANEXOS	70

RESUMEN

CÁRDENAS NARES ARACELI. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES DE HERPESVIRUS CAPRINO TIPO I MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT EN DOS DIMENSIONES (BAJO LA DIRECCIÓN DE: DRA. LAURA COBOS MARÍN Y EL DR. ALEJANDRO BENÍTEZ GUZMÁN).

La infección por Herpesvirus caprino tipo 1 (CpHV-1 por sus siglas en inglés) presenta una distribución mundial mayor al 50%, con una elevada seroprevalencia. El CpHV-1 puede ser causa de abortos, muerte embrionaria, enfermedad respiratoria, vulvovaginitis y balanopostitis pustular de moderada a grave. En neonatos se manifiesta con enteritis, enfermedad sistémica y muerte, establece un estado de latencia en neuronas ganglionares, y puede ser reactivado y excretado después de situaciones de estrés. (Saito *et al.*, 1974, Thiry *et al.*, 2008). En México no existen pruebas específicas para diagnosticar esta enfermedad, es por esto que el objetivo de este trabajo fue identificar proteínas inmunodominantes de un purificado de Herpesvirus caprino tipo 1, a través de sueros de diversos estados de la República Mexicana previamente identificados como positivos mediante la prueba de ELISA. En este trabajo se logró identificar tres proteínas inmunodominantes del CpHV-1, la primera localizándose en un punto isoeléctrico (pI) de 7.3 con un peso de 97 kDa, la segunda con un pI de 6.4 y un peso de 75 kDa y la tercera con un pI de 5.5 y un peso de 55 kDa. Estas podrían corresponder a la gC, la gB y la gE de CpHV-1. Las secuencias obtenidas de dos de las proteínas encontradas, revelan un porcentaje de identidad muy bajo con las reportadas para CapHV-1, por lo que será necesario resolverlas mejor para volver a secuenciarlas.

1. INTRODUCCIÓN

Desde principios de siglo en nuestro país la caprinocultura ha constituido una fuente de trabajo familiar, teniendo un papel trascendente en la cadena alimenticia de las comunidades y representando un medio de sustento. En los últimos años en la región del Bajío y la Comarca Lagunera, la ganadería caprina se ha ido transformando en una importante actividad bien integrada, con buenos indicadores productivos y económicos en donde la mayor parte se destina a la preparación de quesos y dulces (FIRA, 1999, Secretaría de Agricultura, 2013). En la Figura 1 se muestra el porcentaje de cabras existentes en el continente americano (35,996,320) en donde casi la mitad se concentra en México y Brasil (Secretaría de Agricultura, 2013).



En México, la producción caprina se desarrolla en unas 350,000 unidades de producción con una población cercana a nueve millones de cabezas, que se distribuyen fundamentalmente en cuatro zonas: Árida y Semiárida 39.7%, Centro Bajío 21.4%, Región Mixteca 26.4% y Zona Tropical 12.4%, como se muestra en el cuadro uno. (SAGARPA., 2010, SIAP., 2011).

Estado	Población caprina (cabezas)	Carne (Ton)*	Leche (miles de L)*
Coahuila	658,349	5,273	58,835
Oaxaca	1'208,834	4,622	-
Zacatecas	599,788	3,997	5,431
Puebla	1'345,728	3,908	1,749
Guerrero	676,577	3,570	-
San Luis Potosí	616,995	2,792	3,384
Michoacán	466,388	2,573	3,859
Guanajuato	573,068	2,176	25,594
Nuevo León	415,163	1,623	3,974
Durango	323,299	1,341	34,500
Otros	2'120,188	11,964	24,386
Total Nacional	9'004,377	43,839	161,712

Cuadro 1 Principales Estados productores de carne y leche caprina en México. Datos del año 2011 del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA. (SIAP.,2011)

Se estima que el porcentaje de cabritos producidos anualmente por las cabras es de 77%, considerando que es factible lograr un 85% de pariciones en ecosistemas áridos, con un promedio de 1.6 crías por parto y que la mortalidad de crías puede reducirse a un 10%, entonces alrededor de un 40% o 2 millones de estos animales se están perdiendo anualmente. Dado que el peso aproximado de cabritos es de 8kg al momento de su comercialización, entonces anualmente se dejan de producir alrededor de 16 millones de kg de carne de cabrito en pie, o 8 millones de kg en canal. Con estas cifras más de un millón de cabras en los agostaderos tan solo del norte del país no producen leche durante todo un año, representando una pérdida de 75 millones de litros de leche por año (Mellado, 2008)

Lo anterior demuestra la importancia de mejorar la situación actual de la caprinocultura, una de las causas de estas pérdidas son las patologías asociadas a los abortos y muertes de neonatos.

En animales, los herpesvirus constituyen una de las familias virales que tienen relevancia en la medicina veterinaria, ya que principalmente causan infecciones respiratorias, genitales, conjuntivitis, abortos, enfermedades neurológicas y encefalitis.

La familia *Herpesviridae* comprende 3 subfamilias; uno de los principales alfa herpesvirus que afectan la producción de cabras es el Herpesvirus Caprino tipo 1 (CpHV-1 por sus siglas en inglés), que presenta una distribución mundial mayor al 50% con una elevada seroprevalencia (Grewal y Wells, 1986, Fenner *et al.*, 1992).

Cuando la inmunidad y alimentación están comprometidas la enfermedad se presenta de manera subclínica en animales adultos. El CpHV-1 puede ser causa de abortos, muerte embrionaria, enfermedad respiratoria, vulvovaginitis y balanopostitis pustular de moderada a grave. Puede inducir la pérdida de peso y disminución de la producción láctea. En neonatos se manifiesta con enteritis, enfermedad sistémica y muerte (Saito *et al.*, 1974, Thiry *et al.*, 2008).

Después de la infección el CpHV-1 establece un estado de latencia en neuronas ganglionares, el cual puede ser reactivado y excretado después de situaciones de estrés.

1.1 Antecedentes

El CpHV-1 fue aislado por primera vez en 1972 en California en cabras de raza Alpino-Francesa de una semana de edad, que murieron luego de presentar una infección generalizada, disnea, inapetencia y enteritis (Thiry *et al.*, 2007).

Se enviaron muestras al laboratorio, en donde se detectaron cuerpos de inclusión intranuclear, semejante a los del herpesvirus. Cinco años más tarde el CpHV-1 fue identificado en cabras del valle de Bregaglia en Suiza (Saito *et al.*, 1974). Los datos existentes sugieren una distribución mundial con prevalencias variables. La infección ha sido identificada en Australia, Canadá, Estados Unidos, Nueva Zelanda siendo predominante en Europa. Existen

fuertes prevalencias en España, Italia, Grecia y Francia en donde la producción caprina tiene un papel económico importante (Thiry *et al.*, 2008, Piper *et al.*, 2008, Thiry Alain *et al.*, 2006).

En México se registró un primer brote sospechoso en noviembre del 2008, en un hato de 244 cabras ubicado en el municipio de Tequisquiapan Querétaro, en donde se detectaron lesiones como vulvovaginitis y balanopostitis pustular ulcerativa. También se observaron cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos en diferentes órganos de dos animales adultos y un mortinato (Candanosa *et al.*, 2011).

En el año 2011 en el laboratorio de virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) se realizó un aislamiento a partir de muestras de prepucio obtenidas del hato de Tequisquiapan antes mencionado. Este fue identificado mediante la prueba de inmunofluorescencia (IF) con un anticuerpo monoclonal contra CpHV-1 (González Delgado, 2012). En este mismo año se analizaron 45 casos con lesiones sugerentes a CpHV-1 del mismo rebaño, en donde se encontró positividad en el 55.5% de los casos de cabras menores a 15 días y en el 11% de los casos de animales adultos, confirmando la presencia de CpHV-1 en los tejidos de cabras con lesiones compatibles a la enfermedad (Llanos Salinas, 2012a)

En 2013, después de una reactivación de la enfermedad en el hato antes mencionado, se detectaron anticuerpos contra la gB de herpesvirus, mediante la prueba de ELISA de bloqueo o competitiva (IDEXX, IBR, gE/ IDEXX, IBR, gBx2) y el 75% de los animales que presentaban lesiones al momento del muestreo resultaron positivos a la prueba. (García Hernández, 2013) Posteriormente se realizó un muestreo serológico en cabras de los estados de Guanajuato, Querétaro, Puebla, Nuevo León, Morelos y Distrito Federal. Los sueros se

probaron mediante la prueba de ELISA de bloqueo contra la gB antes mencionada y aquellos que fueron positivos a la gB se analizaron con la glicoproteína E (gE) y resultaron negativos. De esta manera se confirmó la seropositividad hacia herpesvirus caprino en un 16.42% de las muestras. (Cobos Marín, 2015)

1.2 Características del Herpes Virus Caprino tipo 1 (CpHV-1)

Como se mencionó anteriormente, el CpHV-1 pertenece a la familia *Herpesviridae*, que se caracteriza por tener virus ADN envueltos de doble cadena. Se clasifican en tres subfamilias de acuerdo a la homología y organización de su genoma, rango de huésped y otras propiedades biológicas. Las tres subfamilias son:

- *Alphaherpesvirinae*, que incluye a los virus citolíticos de crecimiento rápido.
- *Betaherpesvirinae*, compuesta por virus citomegálicos de crecimiento lento.
- *Gammaherpesvirinae*, formada por virus que se desarrollan en los linfocitos y que pueden transformarlos en tumorales (Grewal y Wells, 1986, Fenner *et al.*, 1992, Thiry Alain *et al.*, 2006).

El CpHV-1 pertenece a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* y presenta las siguientes características:

- Variabilidad de hospedadores.
- Ciclo de replicación relativamente corto.
- Difusión rápida a nivel de cultivos celulares.
- Destrucción efectiva de la célula infectada en la mayoría de los casos.
- Capacidad de establecer una latencia primaria, aunque no exclusiva, a nivel de los ganglios sensitivos (Roizmann *et al.*, 1992).

Clasificación Taxonómica de CpHV-1	
Familia	<i>Herpesviridae</i>
Subfamilia	<i>Alphaherpesvirinae</i>
Género	<i>Varicellovirus</i>
Especie	<i>Herpesvirus Caprino 1</i>

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de CpHV-1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2016.

El tamaño estimado del genoma del CpHV-1 es de 137 kbp (Thiry Alain *et al.*, 2006). El diámetro del virión de la familia *Herpesviridae* mide de 120-300 nm (Thiry Alain *et al.*, 2006, Roizmann *et al.*, 1992).

1.3 Estructura

A. **Envoltura:** formada por una bicapa lipídica que envuelve el tegumento, contiene un gran número de glicoproteínas, entre las cuales la glicoproteína B (gB), la glicoproteína C (gC) y la glicoproteína D (gD) son las más abundantes. Estas proteínas desempeñan funciones básicas de interacción con la célula diana (Serra Hartmann *et al.*, 2006, Ros *et al.*, 1999, Thiry Alain *et al.*, 2006).

Las glicoproteínas B, D, H, L y K, son proteínas fundamentales en todos los herpesvirus, debido a que la delección de los genes que las codifican reducen la capacidad in vitro de la replicación viral al participar en la unión de los herpesvirus con la célula diana, así como en la respuesta inmune del hospedador, morfogénesis virales y señalización de la ruta celular de transmisión de la infección (Fehler *et al.*, 1992, König *et al.*, 2002).

Por el contrario, las glicoproteínas no esenciales que son C, E, G, I, J, M y V ya que no hay cambios importantes al no estar presentes (Serra Hartmann *et al.*, 2006, Thiry Alain *et al.*, 2006, Baranowski *et al.*, 1996, König *et al.*, 2002).

- B. **Tegumento:** es característico de los herpesvirus; formado por más de 15 proteínas que cubren la cápside. Facilita el inicio (por transporte de la cápside a través de la célula y entrada del ADN viral al núcleo) y desarrollo de la infección (salida del virón de la célula huésped). Sus proteínas se van al citosol de la célula infectada (Thiry *et al.*, 2006).

- C. **Cápside:** estructura de cuatro proteínas en un patrón icosaédrico de 100 a 110 nm de diámetro, hecho de 150 hexámeros y 12 pentámeros, que brinda protección al core y se ensambla en el núcleo de la célula infectada. La estructura formada por la cápside y el genoma recibe el nombre de nucleocápside (Thiry Alain *et al.*, 2006, Griffin, 1991, Thiry *et al.*, 2006, Keuser *et al.*, 2006).

- D. **Core:** conformado por dos cadenas de ADN lineal. Presenta 26 genes conservados entre las subfamilias de herpesvirus que se denominan genes “core”, se componen por 7 bloques, cada uno con un orden y una orientación transcripcional diferentes (Thiry Alain *et al.*, 2006).

A su paso por la membrana nuclear interna, la primera envoltura lipídica que adquiere la cápside se pierde al llegar al citoplasma. La producción de la progenie viral va acompañada de la destrucción irreversible de la célula infectada (Davison *et al.*, 2009, Thiry Alain *et al.*, 2006, Thiry *et al.*, 2008).

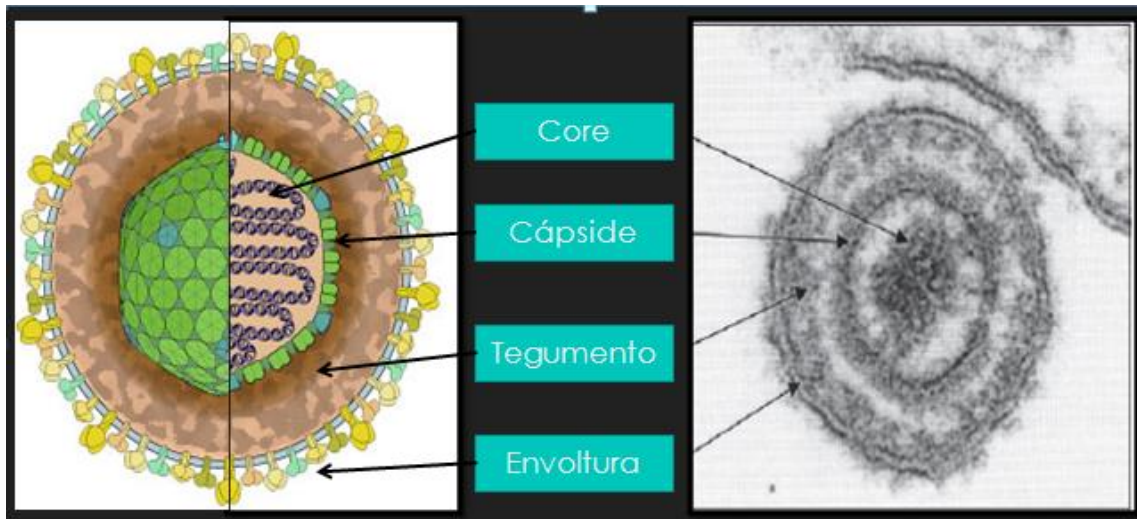


Figura 2. Morfología de los Herpesvirus. Es posible diferenciar cuatro estructuras: el core que contiene ADN de doble cadena, cápside icosaédrica rodeada por tegumento proteico y la envoltura lipídica que contiene a las glicoproteínas (Modificado de Viral Zone y Mettenleiter 2003).

1.4 Ciclo de replicación viral

El CpHV-1 entra a las células por fusión de su envoltura con la membrana plasmática celular, en un proceso independiente de pH y dependiente de la unión de glicoproteínas virales presentes en la envoltura del virus con los receptores en la membrana celular (Wittels y Spear, 1991). Aunque la totalidad de estas moléculas no está completamente dilucidada, está claramente establecida la unión a heparán sulfato (HS) de la membrana celular con las glicoproteínas virales gB y gC (Li *et al.*, 1996). Después de la unión inicial, las gB y gD se unen con alta afinidad a sus receptores en la membrana celular (Wittels y Spear, 1991, Huemer *et al.*, 1992, Li *et al.*, 1995) (Fig 3).

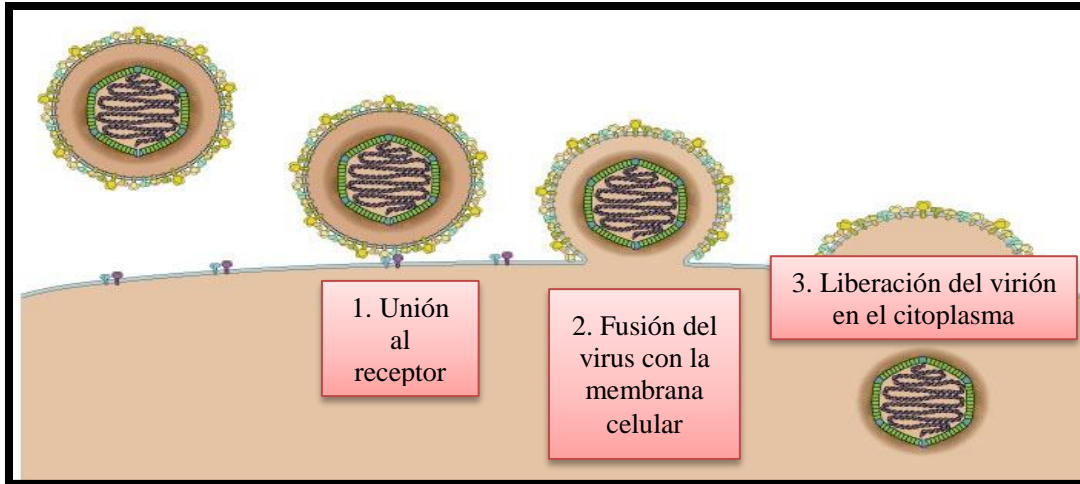


Fig 3. Imagen de la unión y liberación de CpHV-1 a la célula. Modificado de Viral Zone 2016.

Diversos estudios han demostrado que las diferentes glicoproteínas virales (gB, gD, gE, gH, gK, y gL) de CpHV-1 son requeridas en el proceso de entrada del virus a la célula (Schr y Keil, 1999).

Distintos autores han propuesto un modelo que comprende diversas etapas de unión del virus a la célula, según el cual la gC no solo une el virus al HS de la superficie celular, sino que induce la formación de un complejo estable de los receptores para promover la interacción de otra glicoproteína: la gD, con un receptor secundario. Tras la unión de gC y gD se da la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular con la participación de gB y gH (Rue y Ryan, 2003).

Después de la entrada a las células del hospedero, el CpHV-1 es transportado a través de los microtúbulos hasta el núcleo (Fig 4); donde de manera ordenada y secuencial replica su genoma usando proteínas virales y celulares. Dependiendo del momento en que los genes virales son expresados durante la replicación son clasificados en tres clases: inmediatos-tempranos, tempranos y tardíos (Pellett, 2007).

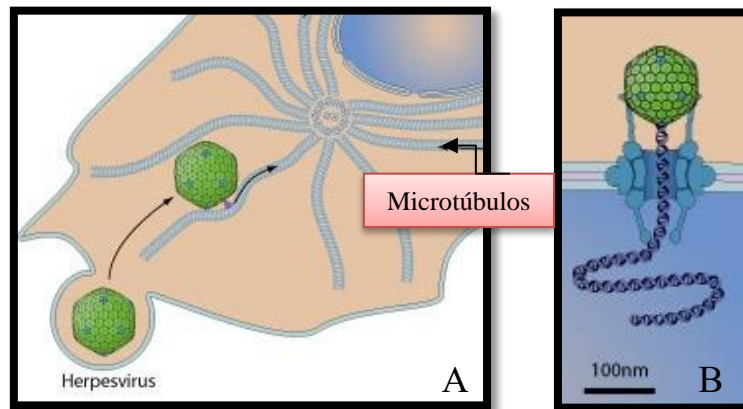


Fig 4. Transporte de CpHV-1 (A) y liberación de ADN viral en el núcleo celular (B), modificado de Viral Zone 2016.

Los genes inmediatos tempranos tienen una función regulatoria y activan a otros genes virales. Los genes tempranos, participan en la síntesis del ADN viral, finalmente los genes tardíos codifican para proteínas estructurales del virus (Pellett, 2007).

La síntesis del ADN viral y el ensamblaje de la cápside ocurren en el núcleo celular. Continuando con el ensamblaje, adquiere su envoltura secundaria y tegumento en el aparato de Golgi por procesos de gemación. Posteriormente son transportados dentro de vesículas intracelulares (trans-Golgi) a la membrana citoplasmática para su posterior liberación de la célula. Finalmente abandonan la célula hospedera por exocitosis mediada por vesículas (Griffin, 1991, Huemer *et al.*, 1992, Pellett, 2007) (Fig 5).

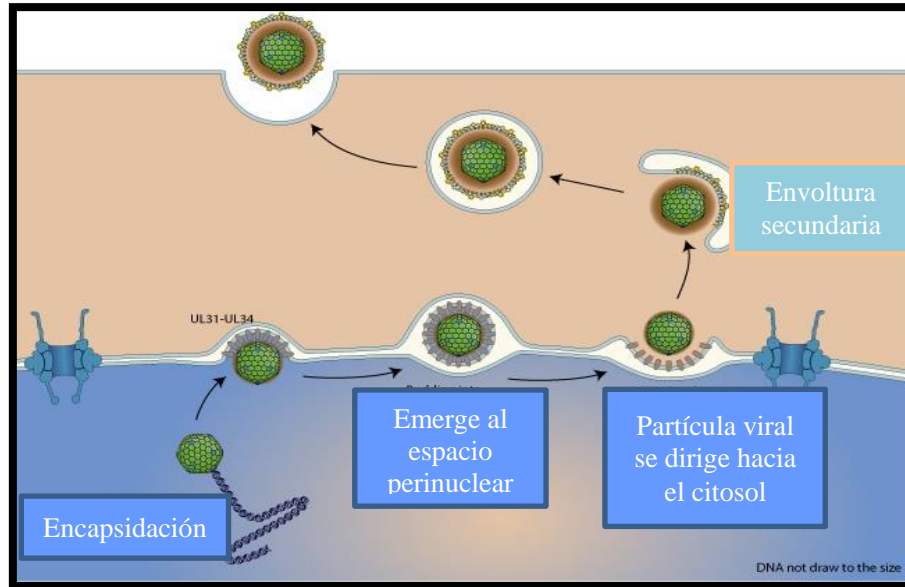


Fig 5. Representación de la salida de CpHV-1 a través de vesículas, modificado de Viral Zone 2016.

La replicación del genoma del CpHV-1 comienza a las dos horas de la infección del animal, con la expresión de antígenos en la superficie celular entre las tres o cuatro horas siguientes a la infección y la liberación de partículas virales y dispersión a las ocho horas pos infección (Babiuk y Tikoo, 1996, Thiry *et al.*, 2006).

1.5 Latencia

El CpHV-1, al igual que la mayoría de los miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, establece una infección latente de por vida, permitiendo al virus permanecer en el hospedador infectado durante largos periodos de tiempo. La presencia de animales portadores latentes es responsable del mantenimiento de la infección en el rebaño. La evolución de la infección es dependiente de los episodios de reactivación viral.

En este periodo no es posible detectar virus infecciosos mediante procedimientos estándar de aislamiento viral, y tampoco hay expresión de los genes virales necesarios para el

establecimiento de una infección productiva. El virus se localiza en neuronas ganglionares del sistema nervioso periférico, pudiendo reactivarse periódicamente y dar lugar a brotes clínicos de la enfermedad (Ruíz Julián, 2008).

La nucleocápside es direccionada por transporte intra-axonal y el virus llega a los cuerpos neuronales sensibles dentro del ganglio trigémino, el ADN permanece en el núcleo de la neurona. Esto permite evadir la respuesta inmune del hospedero, provocando su latencia (Ruíz Julián, 2008, Thiry *et al.*, 2006). Se ha detectado por PCR que el CpHV-1 también se establece en el ganglio sacro (Thiry *et al.*, 2006).

En estudios hechos sobre Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) demuestran la expresión de dos transcritos virales: uno relacionado con latencia (RL) y el ORF-E. Ambos se expresan en forma abundante en ganglios involucrados en la regulación de la latencia, bloquean la infección productiva, y provocan la reactivación de la infección (Bratanich y Jones, 1992). Estos Transcritos Asociados a la Latencia (LATs) son los únicos productos virales sintetizados en grandes cantidades, y tienen un papel anti- apoptótico. Otro modelo sugiere que también tienen un papel en la regulación de la expresión de otros genes virales durante la latencia (Flint *et al.*, 2000, Kent *et al.*, 2003).

El virus es reactivado durante eventos de estrés, inmunosupresión o uso prolongado de corticoides, lo que produce partículas virales que migran usando el transporte axonal anterógrado de la misma neurona por la cual ascendieron, alcanzando el sitio inicial de replicación. Posteriormente es excretado en secreciones a través de las cuales puede infectar a otros animales susceptibles (Bratanich y Jones, 1992, Flint *et al.*, 2000, Ruíz Julián, 2008).

En casos de reactivación con corticosteroides, el virus se aísla sobre todo de hisopados vaginales y ha sido detectado por PCR en el tercer y cuarto ganglio sacro (Buonavoglia *et al.*, 1996, Tempesta *et al.*, 1999b).

1.6 Patogenia

Los animales infectados de forma aguda y latente son la principal fuente de infección. La transmisión del virus se lleva a cabo por vía genital o respiratoria (Engels y Ackermann, 1996, Thiry *et al.*, 2006). En la forma respiratoria y genital que se observan en las cabras adultas es típico encontrar una infección local caracterizada por epiteliotropismo. La diseminación vírica comienza en el organismo con una viremia asociada a los leucocitos, que puede conducir a una infección generalizada, y al subsecuente aborto al atravesar la barrera placentaria. La transmisión por vía oral y nasal ha sido demostrada experimentalmente, y raramente produce signos, pero puede ser responsable de abortos en la cabra adulta. En cambio, los recién nacidos pueden infectarse por vía nasal en el periodo perinatal, así como al final de la gestación como consecuencia de una infección intrauterina (Grewal y Wells, 1986, Smith, 1997, Thiry *et al.*, 2006).

Después de una infección intranasal se presenta una replicación local produciendo una lesión epitelial en la cavidad nasal, seguida por una viremia asociada a células mononucleares que puede llevar a una infección sistémica y abortos en la segunda mitad de la gestación. El virus finalmente alcanza el tracto genital con la aparición de las lesiones características: vulvovaginitis ulcerativa en hembras y balanopostitis ulcerativa en machos, ambas con títulos virales (Candanosa *et al.*, 2011, Engels y Ackermann, 1996, Thiry *et al.*, 2006). La replicación es limitada a esta zona, otros signos que se presentan son eritema, edema y vesículas (Thiry *et al.*, 2006). Las lesiones microscópicas consisten en necrosis tisular y cuerpos de inclusión en múltiples órganos (Thiry *et al.*, 2006).

La viremia asociada con la inoculación intranasal ha sido demostrada experimentalmente mediante la recuperación del virus o su detección por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en fetos abortados, (Saito *et al.*, 1974). Los informes tanto de infección natural como

experimental, indican que el aborto y los neonatos muertos causados por el CpHV-1 son resultado de la viremia (Saito *et al.*, 1974, Engels y Ackermann, 1996). Se sugiere que el virus permanece latente en la placenta, y cuando pasa al feto, produce lesiones necróticas diseminadas, ya que los fetos abortados y neonatos muertos muestran la presencia del CpHV-1 o el ADN viral en hígado (Engels y Ackermann, 1996, Saito *et al.*, 1974).

En estudios con inoculaciones intranasales, se observó que las cabras comenzaron a presentar fiebre (39.9-40.4 °C) a partir del día cuatro postinoculación (PI) y ésta duró 7 días, durante este periodo los animales también presentaron leucopenia y finalmente lesiones ulcerativas en vulva en el séptimo día PI, se recuperó el virus a partir de hisopados nasales en los días 5-9 PI y entre los días 6-9 PI en los hisopados vaginales (Mettler *et al.*, 1979, Tempesta *et al.*, 1999a, Thiry *et al.*, 2006).

Cuando las cabras son inoculadas intravaginalmente de manera experimental, la presencia de la infección se manifiesta con lesiones genitales, y el virus se puede aislar 5 a 7 días post infección a partir de hisopos vaginales y no de hisopos oculares, nasales o rectales; sugiriendo que la infección genital puede establecerse sin causar viremia (Tarigan *et al.*, 1987, Tempesta *et al.*, 1999a).

En neonatos la presentación es sistémica, con elevada morbilidad y mortalidad provocada por una enteritis necrótica (Tempesta *et al.*, 1999a, Keuser *et al.*, 2002, Roperto *et al.*, 2000, Thiry *et al.*, 2006, Tempesta *et al.*, 2004a).

Durante la presentación aguda, el virus es excretado vía ocular, nasal y genital (Engels y Ackermann, 1996, Saito *et al.*, 1974).

1.7 Signos clínicos y lesiones observables a la necropsia

En neonatos de una a dos semanas de edad se observa la forma generalizada con debilidad progresiva, fiebre, dolor abdominal, cianosis y ritmo cardiaco acelerado. El miocardio se torna edematoso. A la percusión y palpación, el contenido intestinal es líquido. Tras la manipulación del animal se presenta emisión de heces acuosas, amarillas, con estrías de sangre, pero no hay diarrea (Berrios *et al.*, 1975, Homer *et al.*, 1982, Mettler *et al.*, 1979). En la mucosa del tracto digestivo se observan lesiones inflamatorias y necróticas, a veces hemorrágicas. En el ciego y colon se puede presentar ulceración de la mucosa, con necrosis y edema, acompañado de inflamación de la submucosa. Las células hepáticas se muestran hinchadas y vacuoladas, con presencia de cuerpos de inclusión intranucleares (Candanosa *et al.*, 2011, Llanos Salinas, 2012b, Smith, 1997, Smith y Sherman, 2009). También se observa conjuntivitis, secreción nasal de serosa a purulenta, úlceras en los septos nasales y erosiones en la cavidad bucal. Puede verse neumonía intersticial no purulenta. Cuatro días después de la infección pueden presentarse lesiones ulcerosas en la piel y pezuñas (Smith y Sherman, 2009) De uno a cinco días ocurre la muerte, precedida de un estado comatoso. Algunos animales sobreviven o mueren al cabo de dos meses en estado de debilidad.

En el caso de los adultos se presentan tres formas: respiratoria, genital y abortiva. La primera se caracteriza por neumonía aguda, asociada a CpHV-1 encontrándose en ocasiones relacionada con *Mannheimia haemolytica* provocando consolidación en los lóbulos craneoventrales del pulmón, acompañada en ocasiones de exudado pleural fibrinoso. Esta patología se observa muy raramente (Smith, 1997).

Los signos clínicos de la forma genital, se presentan en la mucosa de la vulva y de la vagina observándose hiperemia, petequias y edema, así como numerosas pápulas y vesículas que se fusionan para formar úlceras. Los signos sistémicos de la enfermedad no son observados. Las

lesiones desaparecen de cuatro a seis días. Lesiones similares se observan en el pene y prepucio del macho cabrío (Candanosa *et al.*, 2011, Engels y Ackermann, 1996, Grewal y Wells, 1986, Homer *et al.*, 1982, Tarigan *et al.*, 1987, Thiry *et al.*, 2006, Smith y Sherman, 2009).

Los abortos producidos por el CpHV-1 tienen lugar durante el segundo tercio de la gestación; la mayoría antes del parto, sin presencia de signos. La infección experimental puede inducir aborto, ya sea por vía intravenosa, o por vía nasal (Smith, 1997). Los fetos no presentan lesiones macroscópicas; Sin embargo, el examen histopatológico del hígado, pulmones y bazo revela necrosis multifocal (Llanos Salinas, 2012b, Smith y Sherman, 2009). Se pueden observar hemorragias en pulmón. En las cavidades corporales pueden encontrarse exudados sanguinolentos (Engels y Ackermann, 1996).

1.8 Respuesta inmune y evasión

La sobrevivencia del virus en cada paso de su ciclo de infección depende en gran parte de la capacidad de evasión a la respuesta inmune.

Al infectarse con el CpHV-1, las células pueden responder con la liberación de citocinas, que son glicoproteínas que permiten la comunicación intercelular y funcionan localmente o con respuestas sistémicas como: inflamación, inducción de estado antiviral en células vecinas y la orientación de la respuesta adaptativa (Romero Cabello, 2007, Jonjić *et al.*, 2008).

La respuesta innata ante una infección viral está compuesta principalmente por interferones tipo I ($\text{INF}\alpha$ y β), citocinas que inhiben la replicación viral, bloquean la transcripción o traducción, inducen un estado antiviral en células infectadas inhibiendo el crecimiento celular. Los interferones presentan acción estimulante sobre la fagocitosis y activan a las células NK (por sus siglas en inglés natural killer) que son células de origen linfóide con actividad citotóxica que reconocen y destruyen a las células infectadas por virus liberando

perforinas y granzimas. Algunos herpesvirus como el citomegalovirus disminuyen la expresión de ligandos activadores de células NK siendo blancos para la evasión viral (Jonjić *et al.*, 2008).

Otros componentes importantes de la respuesta inmune son el complemento, los macrófagos y neutrófilos. El sistema de complemento, lisa a virus envueltos dando lugar a la fragmentación de la envoltura y la desintegración de la nucleocapside. También participa en la lisis de las células infectadas (Romero Cabello, 2007).

Algunos herpesvirus como Epstein Barr (EBV) utilizan mecanismos de evasión aumentando la expresión de homólogos de citocinas inmunosupresoras como la interleucina 10 (IL-10) así como al impedir la expresión del interferón tipo 1 al bloquear la activación del factor de transcripción IRF7. Este virus también puede activar la vía alterna y la de las lectinas del complemento generando cierto grado de neutralización por la formación de agregados virales más grandes (Lubinski *et al.*, 1998).

Según estudios con herpesvirus simplex (HSV) la gC es una de las moléculas de evasión del sistema de complemento mejor caracterizadas. Esta se une al factor C3, e inhibe la acción de la C3 convertasa. También inhibe la unión de C3b a los factores del complemento: properdina y C5 (Friedman *et al.*, 1984). Con esto la gC protege al virus del ataque del complemento tanto al inhibir su activación, como al impedir la lisis de las células infectadas mediada por complemento (Lubinski *et al.*, 1998, Lubinski *et al.*, 2002).

Uno de los mecanismos para el éxito de la infección viral es la evasión de la respuesta inmune específica, a través de la disminución de la expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC) en las células. Una de las principales funciones de estas moléculas es la presentación local de antígenos para la activación de linfocitos T a través de la interacción con las células presentadoras de antígenos como las células dendríticas, importantes en infecciones virales,

al expresar altos niveles de MHC y coestimular a los linfocitos T (Hewitt, 2003, Lipińska *et al.*, 2006).

Los linfocitos T expresan un receptor de antígeno de superficie TCR gracias al cual pueden reconocer antígenos virales mostrados tanto por la célula presentadora de antígenos como por la célula infectada. En el caso particular de los linfocitos TCD4 presentan actividad antiviral al liberar citocinas como el interferón gamma (Zuo y Rowe, 2012).

El resultado de activar un TCD4 es la cooperación con los linfocitos B para producir los diferentes isotipos de anticuerpos antivirales que actúan en forma específica en la neutralización viral (IgG e IgA) y para que algunos de los linfocitos B se diferencien en células de memoria que rápidamente proliferan y secretan inmunoglobulinas ante una reinfección (Zuo y Rowe, 2012, Hewitt, 2003, Lubinski *et al.*, 2002).

Los linfocitos CD8 participan en la lisis de las células infectadas con virus al reconocer péptidos virales en las MHC I en la superficie celular de células infectadas y destruirlas a través de perforinas y granzimas (Zuo y Rowe, 2012). Además de que también liberan interferón gamma.

La alteración de la síntesis de proteínas de la célula infectada, una vez que comienza el ciclo lítico es una característica de los alfa herpesvirus, que les permite evadir la detección por MHC I y II (Zuo y Rowe, 2012, Hewitt, 2003).

La respuesta inmune humoral primaria se caracteriza por tener un mayor número de inmunoglobulinas M, que son muy eficaces en la activación de la vía clásica del complemento. Más tarde, predominan las inmunoglobulinas G que tienen una mayor afinidad al antígeno y pueden neutralizar a los virus y favorecer la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) al facilitar la acción de los linfocitos NK. En el caso de las superficies

mucosas la IgA secretora permite la neutralización viral. (Zuo y Rowe, 2012, Romero Cabello, 2007).

1.9 Relación con otros alfa herpes virus

El Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV-1) se ha considerado como virus de referencia para el estudio de CpHV-1, ya que el ciclo de replicación, latencia y patogénesis en cabras infectadas es muy similar (Thiry *et al.*, 2006, Ros y Belák, 1999).

Con los análisis filogenéticos se ha encontrado que el CpHV-1 es el más distante entre los *Alphaherpesvirus* de rumiantes. El porcentaje de identidad con respecto al BoHV-1 es el siguiente: la glicoproteína B (gB) tiene un 78.5%, la glicoproteína D (gD) un 68.8% y la glicoproteína C (gC) el 55.6% (Ros y Belák, 1999, Thiry *et al.*, 2006) (Fig 6).

El herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) es el *Alfaherpesvirus* más estrechamente relacionado con BoHV-1. Este virus muestra diferencias antigénicas para la gE, por lo que esta glicoproteína se utiliza como base para el diagnóstico del CpHV-1 mediante el uso de la prueba de ELISA, junto con la gB (la más conservada entre los Herpesvirus) y la gC (Thiry *et al.*, 2008, Wellenberg *et al.*, 2001).

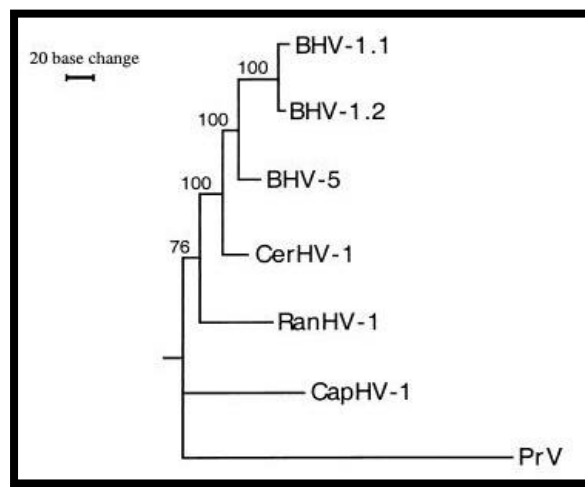


Fig 6. Árbol filogenético de los Alfaherpesvirus en rumiantes. Basado en regiones de gB y gD. PrV fue usado como grupo externo, tomado de Ros y Belák, 1999.

1.10 Diagnóstico

El diagnóstico de CpHV-1 se realiza a partir de cuatro pruebas, tres de ellas son serológicas: el inmuno Ensayo Enzimático (ELISA), la seroneutralización (SN) y Inmunofluorescencia indirecta (IF) y una prueba molecular: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- **ELISA.** Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima que reaccionará con el sustrato que producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante espectrofotómetro o colorímetro. Actualmente el diagnóstico serológico de CpHV-1 se realiza mediante el uso de dos kits de ELISA comerciales de tipo competitivas para BoHV-1, debido a la homología que existe entre ambos virus (Keuser *et al.*, 2004, Marinaro *et al.*, 2010), se ha encontrado que, a pesar de que el BoHV-1 es capaz de infectar a cabras, esta infección no es relevante ya que no las afecta (Thiry *et al.*, 2007). Para ello se utiliza un primer kit que detecta anticuerpos contra la gB (SERELISATM IBR/IPV gB Ab Mono Blocking, Synbiotics Europe, Lyon, France), que al ser la más conservada entre los herpesvirus debe reconocer un suero positivo. Sin embargo, este kit no diferencia entre BoHV-1 y CpHV-1. Para ello se recurre al uso de un segundo kit que detecta anticuerpos contra la gE (Herdchek Anti-IBR gE, Idexx, Germany) que al tener menor homología entre BoHV-1 y CpHV-1 no es reconocida por los sueros de cabras infectadas con herpes caprino. De esta manera el diagnóstico actual para CpHV1 se confirma cuando un animal es positivo a la gB y negativo a la gE (Mettler *et al.*, 1979, Thiry y Thiry, 2008). Esta técnica es rápida, económica y es un método sencillo para procesar varias muestras.

- **SN.** Se realiza en cultivo celular empleando células de riñón de bovino de la línea Madin-Darby (MDBK) infectadas con 75 UFP (Unidades Formadoras de Placa) de la cepa BA-1 de CpHV-1 o 75 UFP de la cepa Iowa de BoHV-1 (Lemaire *et al.*, 1999, Miller y Van Der Maaten, 1984), para determinar el título de anticuerpos seroneutralizantes contra

CpHV-1 en sueros sospechosos, es una técnica sensible y específica para la caracterización viral por métodos serológicos, sin embargo la incubación debe realizarse por 72 horas, para después observar al microscopio la presencia de efecto citopático.

- **IF.** Se emplean anticuerpos monoclonales murinos (Mabs) específicos contra gC del CpHV-1: Esta prueba permite distinguir entre los diferentes herpesvirus de ruminantes (Ros y Belák, 1999, Thiry *et al.*, 2006) de manera rápida, sin embargo tiene la desventaja de ser más cara al utilizar anticuerpos monoclonales aunado a esto se debe contar con un microscopio de fluorescencia y personal capacitado para la interpretación de las pruebas.
- **PCR.** El método consiste en separar por calor las cadenas de una molécula de ADN de doble cadena, para posteriormente permitir que dos iniciadores se fijen a una secuencia específica en cada extremo de la secuencia blanco y al final obtener réplicas exactas de la secuencia blanco gracias a la polimerasa. Se realiza a partir de hisopos nasales/ vaginales, de muestras de tejido y células MDBK infectadas. Los iniciadores que se han empleado amplifican ciertas regiones conservadas para las diferentes glicoproteínas (Elia *et al.*, 2008, Saito *et al.*, 1974, Tempesta *et al.*, 1999a). Esta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo no es recomendable como un método tamiz y los iniciadores disponibles son de otras regiones del mundo lo cual podría dificultar su diagnóstico en México.

2. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, no existen kits comerciales exclusivos para el diagnóstico serológico del CpHV-1, por lo que se utilizan dos kits para BoHV-1. El contar con una prueba para la detección de anticuerpos contra CpHV-1, desarrollada en México, empleando un aislamiento mexicano reduciría los costos y nos brindaría mayor especificidad al utilizarlo como prueba diagnóstica ya que al usar herramientas de otros países, existe la posibilidad de tener cierto grado de diferencias antigénicas. Para que sea posible desarrollar esta prueba de manera efectiva es necesario emplear un antígeno identificado y conocido, como podrían ser las proteínas inmunodominantes del aislamiento mexicano, de manera que se puedan emplear en un futuro para el diagnóstico de esta enfermedad en México.

El atender esta enfermedad de forma oportuna y certera, podría evitar pérdidas o retrasos en la producción, lo que aumentaría notablemente los ingresos de los caprinocultores.

3. HIPÓTESIS

Las proteínas inmunodominantes del asilado mexicano de CpHV-1 serán reconocidas por sueros de cabras previamente identificados como positivos a la enfermedad.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar proteínas inmunodominantes de un purificado de herpesvirus caprino tipo 1, a través de sueros de diversos estados de la República Mexicana previamente identificados como positivos.

4.1 Objetivos particulares

1. Cultivar el asilado de CpHV-1 en la línea celular MDBK y purificarlo mediante su precipitación con polietilenglicol, para emplearlo como antígeno en una prueba de Western Blot.
2. Demostrar mediante SDS-PAGE, y Western Blot la presencia de proteínas inmunodominantes, reconocidas por sueros de cabras previamente identificadas como positivos a CpHV-1, para hacer su posterior caracterización.
3. Determinar las características fisicoquímicas de las proteínas inmunodominantes mediante isoelectroenfoque en geles de doble dimensión para su posterior secuenciación y a su vez obtener un perfil de resolución más exacto que el de una dimensión.
4. Concentrar las proteínas de CpHV-1 mediante inmunoprecipitación y ultracentrifugación para evaluar su uso como un método de purificación de las proteínas inmunodominantes.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestra en la figura 7 el diagrama representativo de la metodología utilizada de forma sintetizada durante todo el proceso experimental.

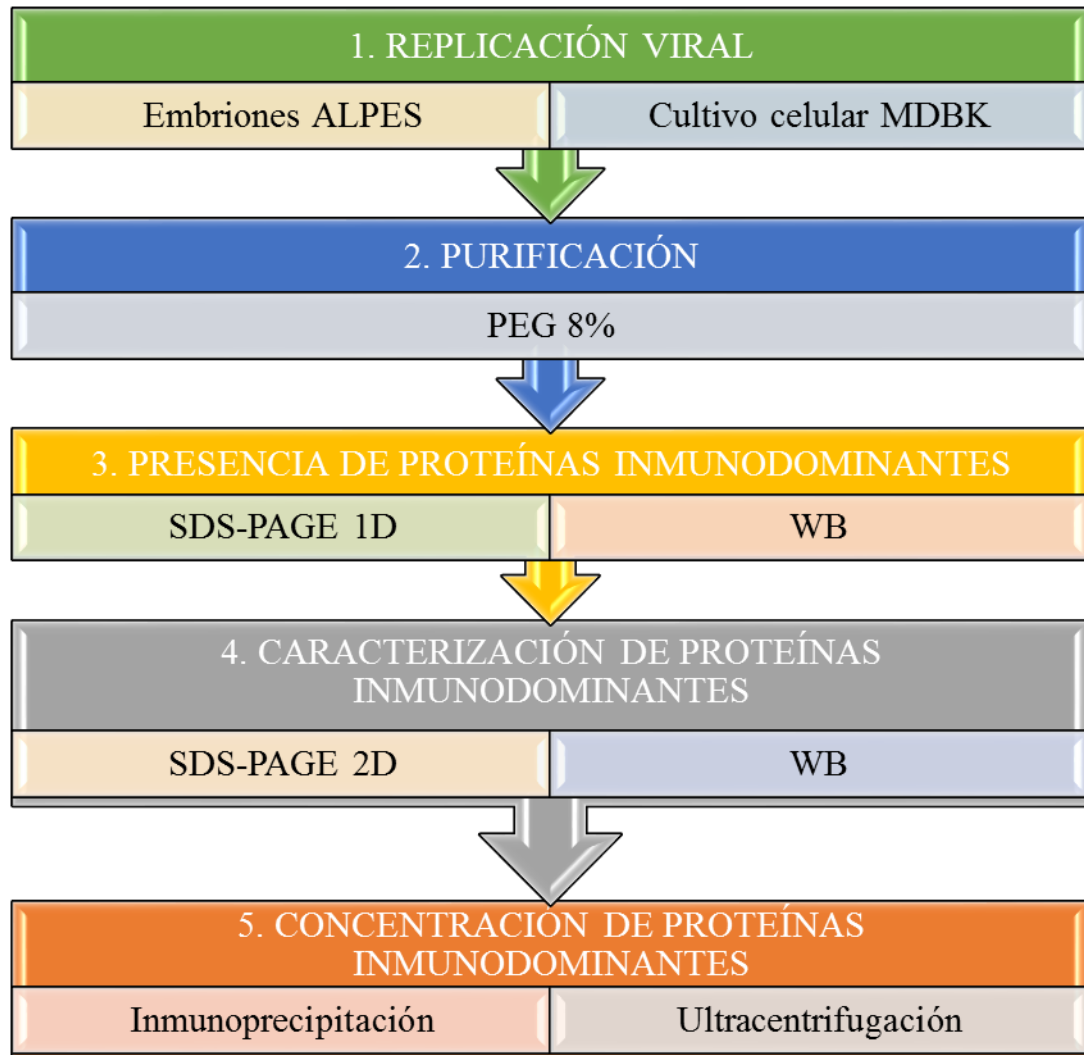


Fig. 7. Diagrama representativo de la metodología experimental utilizada.

5.1 REPLICACIÓN VIRAL

5.1.1 Elaboración del inóculo

Se utilizó una membrana corioalantoidea (MCA) de embrión de pollo previamente infectada con el virus aislado en 2012 (González Delgado, 2012), de la cual se obtuvieron lesiones pustulares que se pesaron y con ello se preparó un inóculo al 20%, se centrifugó a 500g por 10 min y el sobrenadante se guardó en un tubo estéril. Se utilizó como antibiótico penicilina (concentración de 100 UI) y estreptomina (concentración de 100 µg) a una dosis de 0.1 ml por 10 ml en el sobrenadante.

Se realizaron pruebas de esterilidad en agar sangre y caldo tioglicolato a 37⁰C durante 48 horas.

5.1.2 Características e inoculación en embrión de pollo.

Para el aislamiento viral se utilizaron embriones de pollo, procedentes de Aves Libres de Patógenos Específicos ALPES[®] de 9 a 12 días de edad, a los que se les verificó la viabilidad por ovoscopia. La inoculación se realizó conforme a lo ya descrito (Del Castillo Calva y Gómez Arroyo, 2016). Se depositaron 0.5ml del inóculo sobre la MCA y se dejó incubando a 37⁰C con 62% humedad por 5 días (Del Castillo Calva y Gómez Arroyo, 2016). Posteriormente se realizó la colecta de las lesiones pustulares que fueron observadas en la MCA en tubos estériles y fueron congeladas a -80⁰C hasta su uso (Del Castillo Calva y Gómez Arroyo, 2016).

5.1.3 Cultivo celular.

Se utilizaron Células de Riñón de Bovino en inglés Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), con Medio Esencial Mínimo (DMEM) y suplementadas con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%.

Cuando las células llegaron a un 80% de confluencia en una caja de 75 cm² se procedió a infectarlas con 1 ml de inóculo. Se incubaron por 60 minutos en agitación, y posteriormente se adicionaron 14 ml de DMEM. Se buscó la presencia de los diferentes efectos citopáticos (EFC) cada 24 horas hasta completar los 5 días. Como testigo negativo se utilizaron células MDBK sin infectar.

5.1.4 Cosecha del virus a partir del cultivo celular.

Para la obtención del virus a partir del cultivo celular se desprendieron las células de forma mecánica mediante pipeteo, el contenido se sonicó durante 10 min a una temperatura de 37°C en un sonicador Branson 5510® (modelo SS10R-DTH) y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 15 min a 4°C. Del sobrenadante que se obtuvo se realizaron alícuotas y se congelaron a -20°C, transcurridas dos horas se pasaron a -80°C (en caso de no ser utilizado de inmediato).

5.2 PRECIPITACIÓN DE CpHV-1

5.2.1 Polietilenglicol (PEG)

El sobrenadante del cultivo celular, se precipitó en PEG (peso molecular de 76,0745 g/mol) de Sigma-Aldrich® al 8%, dejándolo en agitación de 12 a 16 horas. Transcurrido este tiempo se colectó el líquido obtenido y se centrifugó a 17,000g durante 2 horas a 4°C, se decantó el

sobrenadante y la pastilla se re suspendió en 1 ml de Amortiguador Tris Ácido Clorhídrico EDTA (TNE) (Ver anexo de soluciones y reactivos). Posteriormente se dializó en una membrana de celulosa Spectra/Por[®] de un diámetro de 16 mm y un punto de corte de 12,000-14,000 Daltones. Se colocó en un matraz con Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X y se dejó en agitación por 12-16 horas a 4°C.

Se realizaron tres recambios de PBS cada 24 horas y una vez finalizados se procedió a pasarlo a tubos de 1.5 ml, se dispuso a -20 °C y después de dos horas se colocó a -80 °C (en caso de no ser utilizado de inmediato). Este precipitado se empleó en la técnica de SDS en una dimensión y western blot.

5.3 PRESENCIA DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES POR WESTERN BLOT

5.3.1 Gel SDS-PAGE 1D

Se realizó un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% en el sistema vertical Mini Protean Bio Rad[®] de 1 mm de grosor.

Se cuantificó cada muestra de los pasos previos en el espectrofotómetro AmpliQuant07[®]. Posteriormente se colocaron 20 µg de cada una en un tubo de 1.5 ml, junto con el Buffer de carga Laemmli 2X, (Ver anexo de soluciones y reactivos). Se calentaron a 96°C por 15 minutos en el Thermomixer confort Ependorf 1.5 ml[®] y se depositaron en distintos pozos del gel, en condiciones reductoras. En el carril uno se colocaron 4 µl de Marcador de Peso (MP) Precision Plus Protein [™] All Blue Standars de Bio Rad[®] y se procedió a realizar la

electroforesis a 15 mA/ gel (mili amperaje constante) durante 70 minutos con el Buffer de corrida (Ver anexo soluciones y reactivos).

5.3.2 Western Blot (WB)

Se utilizó una membrana de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF) Immun-Blot Bio Rad[®] a 100V (Voltaje constante- Mili amperaje variable) durante 70 minutos, con el Buffer de Transferencia (Ver anexo soluciones y reactivos). Se verificó con Rojo de Ponceau que la transferencia fuese exitosa.

Cuando finalizó la transferencia, se procedió a preparar 10 ml de solución de bloqueo al 5% (Ver anexo de soluciones y reactivos) y se colocó en agitación durante un periodo de 1 hora. Transcurrida la hora, se eliminó por decantación y se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X en agitación. Posteriormente se agregó el anticuerpo primario en una dilución 1/3000 con PBS. Este correspondió a un conjunto de 25 sueros de diferentes estados de la República Mexicana previamente identificados como positivos a CpHV1 (García Hernández, 2013). La membrana se incubó en agitación durante 12 a 16 horas a 4⁰C. Después del tiempo estipulado, se eliminó el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados con PBS en cantidad suficiente.

Se utilizó la Proteína G BioRad[®] que se une a la fracción Fc del anticuerpo primario, en una dilución de 1/10000 con solución de bloqueo al 3%. Se incubó en agitación a 4⁰C durante una hora.

Para evidenciar las bandas inmunodominantes, se utilizó la técnica de Quimioluminiscencia con el kit Super signal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate de Thermo Scientific[®], el cual consta de dos elementos; el luminol que al ser un compuesto químico reacciona con

el agente oxidante en este caso el peróxido de hidrógeno, y esto en presencia de la peroxidasa de rábano de la proteína G o de el anticuerpo secundario cataliza la oxidación del luminol con lo cual liberó energía (protones) en forma de luz que fué captada por una placa fotográfica CL-Xposure™ Film Thermo Scientific®, esta técnica fué de gran utilidad al ser estable, sensible, rápida y específica.

Como control después de este resultado también se utilizaron sueros de cabras identificados como negativos en trabajos previos a través de los kits de ELISA (García Hernández, 2013), con las mismas condiciones previamente descritas.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES

Para preparar la muestra para su corrimiento en dos dimensiones las proteínas se precipitaron con Ácido Tricloro Acético (TCA), para ello se colocaron 400 µg de proteínas en un tubo de 1.5 ml, se agregó TCA de Meyer® al 13.3% w/v a -20°C, se mezcló por inversión 30 seg y se dejó incubando por 1.5 horas a -20 °C; posteriormente se centrifugó a 12,000 xg por 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Una vez finalizado este proceso se dejó secar el pellet por 5 min. Para finalizar se re suspendió en 125 µl por muestra en Buffer de Rehidratación Ready Prep™ 2D Starter Kit Bio Rad®, protocolo modificado (Boguth *et al.*, 2000). Este precipitado se empleó en la técnica de SDS-PAGE en dos dimensiones y western blot para la caracterización de las proteínas inmunodominantes.

5.4.1 SDS-PAGE 2D

Se utilizó una tira de IPG Ready Strip™ Bio Rad® de 7 cm con un rango de pH de 3-10 colocando la parte del gel en contacto con la muestra de proteínas previamente precipitada. Después de esto se colocaron de 850µl de aceite mineral sobre la tira, como medida de protección y se dejó un periodo de 12-16 hrs a temperatura ambiente.

5.4.2 Isoelectroenfoque

Se utilizó el equipo de isoelectroenfoque Protean IEF Cell de Bio Rad® (número de serie 07975), colocando 1 ml de aceite mineral sobre la tira. Se programó de acuerdo a las condiciones del fabricante 8-10,000 V- hrs con un voltaje final de 4,000 V.

Una vez concluido este proceso se colocó 1 ml de Buffer de Equilibrio I Ready Prep™ 2D Starter Kit Bio Rad® por 10 min en agitación y después se colocó 1 ml del Buffer de Equilibrio II Ready Prep™ 2D Starter Kit Bio Rad® por 10 min en agitación a temperatura ambiente.

5.4.3 Electroforesis

Se colocó la tira en contacto con el gel de resolución al 10%. Se agregó 1 ml de agarosa de bajo punto de fusión Ready Prep™ 2D Starter Kit Bio Rad®, encima de la tira y se dejó a 4°C hasta su polimerización, posteriormente se colocaron 4 µl del MP All Blue Bio Rad®.

En seguida se realizó la electroforesis con 15 mA/ gel (mA constante) por 70 min.

5.4.4 Western Blot

Se realizó bajo las mismas condiciones antes descritas y se reveló a través de la técnica de Quimioluminiscencia con sueros positivos a CpHV-1.

5.5 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS

INMUNODOMINANTES

Para estimar el peso molecular (PM) de las proteínas se comparó con la distancia de migración del patrón de proteínas de peso molecular conocido (MP). Se construyó una curva de calibración en donde se graficaron los $\log(\text{PM})$ vs la relación entre la distancia de migración de la banda proteica (R_f) (d) y la longitud de corrida total del gel (I) o sea la distancia desde el borde superior del gel hasta el frente de corrida. Con estos valores se obtuvo la ecuación lineal $\log(\text{PM})=m \times R_f+b$ (m =pendiente; b =ordenada al origen). Luego se calculó el R_f de la proteína incógnita y se extrapolo en la curva el $\log(\text{PM})$, se aplicó el antilogaritmo obteniendo así el PM de las proteínas.

Se mandaron a secuenciar dos puntos de proteínas inmunodominantes al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) a través de la técnica de espectrofotometría de masas. Las secuencias obtenidas analizaron mediante el programa computacional MEGA[®], utilizando Clustal W como método matemático.

5.6 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES.

Para concentrar las proteínas inmunodominantes se evaluaron dos métodos, el primero a través de la inmunoprecipitación utilizando sueros positivos a CpHV-1, mientras que para el segundo método se utilizó la ultracentrifugación a partir de la muestra precipitada con PEG al 8%.

5.6.1 Inmunoprecipitación

Para este procedimiento se utilizó Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo (PMSF) Sigma-Aldrich a una concentración de 0.1 mM y 10 µl del cóctel inhibidor de proteasas Sigma-Aldrich[®]. Se agregaron 5 µl de sueros previamente identificados como positivos con ELISA y 1ml de la muestra de CpHV1 a partir del cultivo celular sonificado. Se dejó incubando de 12-16 hrs. Posteriormente se agregaron 10 µl de perlas de agarosa Affi-Gel[®] con proteína A de Bio Rad[®] y se dejó en agitación por 1 hora a 4 °C. Después se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min a 4°C para luego realizar tres lavados de 250 µl con PBS 1x. Finalmente se decantó el sobrenadante, se agregaron 40 µl de Buffer de Carga Laemmli. (Ver anexo soluciones y reactivos),

Se realizó un SDS-PAGE 1D en un gel al 10% colocando la muestra antes inmunoprecipitada. Posteriormente se realizó un WB utilizando como primer anticuerpo suero hiperimmune elaborado previamente (Llanos Salinas, 2012b) a una concentración de 1/500 y como conjugado un anticuerpo secundario anti IgG de conejo marcado con peroxidasa de Sigma Aldrich[®] a una concentración de 1/15000. Se reveló con la técnica de Quimioluminiscencia previamente descrita.

Después de esto se realizó un SDS-PAGE 2D al 10% y su subsecuente WB a partir de la muestra inmunoprecipitada utilizando las mismas concentraciones y reactivos que para el SDS-PAGE 1D.

5.6.2 Ultracentrifugación.

El material dializado se purificó por ultracentrifugación a través de gradientes de sacarosa al 30%, 45% y 60% en tubos Beckman Coulter® se adicionó la muestra precipitada con PEG y se programó la centrífuga a 23,000 rpm por 3 horas a 4°C (Rotor SW 40 TI).

Para la recolección de las bandas se colocó Parafilm® en la boca del tubo para formar vacío; se realizó un pequeño orificio con ayuda de una aguja de insulina en la base del tubo (girando la aguja). Se recolectó por goteo en diferentes tubos; por una parte la sacarosa y por otra las bandas obtenidas. Las bandas recolectadas se centrifugaron nuevamente, por 1 hora a 20,000 rpm a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se re suspendió con Tris Ácido clorhídrico (TN) en 200 µl (Ver anexo de soluciones y reactivos), se mantuvieron a -80 °C hasta ser utilizados.

A partir de las bandas obtenidas se realizó un gel SDS-PAGE 1D al 10% de acuerdo a lo descrito en un inicio.

6. RESULTADOS

6.1 REPLICACIÓN VIRAL

6.1.1 Embrión de pollo

A partir de una lesión pustular previa, se volvió a inocular en embriones de pollo por falsa cámara. Los resultados observados al quinto día post infección, fueron los siguientes: lesiones en la MCA como; congestión, edema, engrosamiento y lesiones pustulares de 3cm de diámetro, a diferencia del control negativo, en el cual no se observó ningún cambio aparente (Figura 8). Estos hallazgos sugieren la presencia de un herpesvirus.

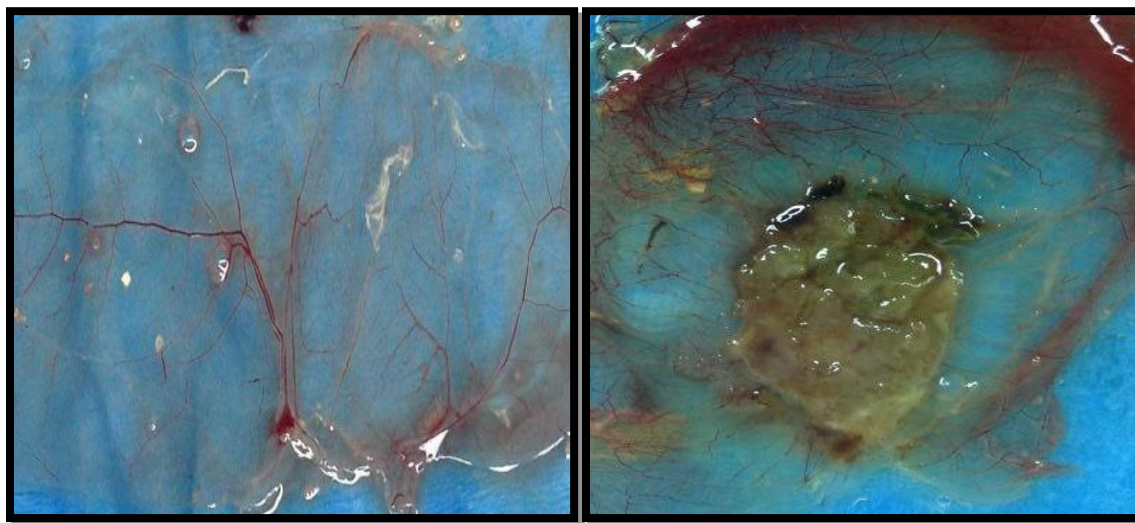
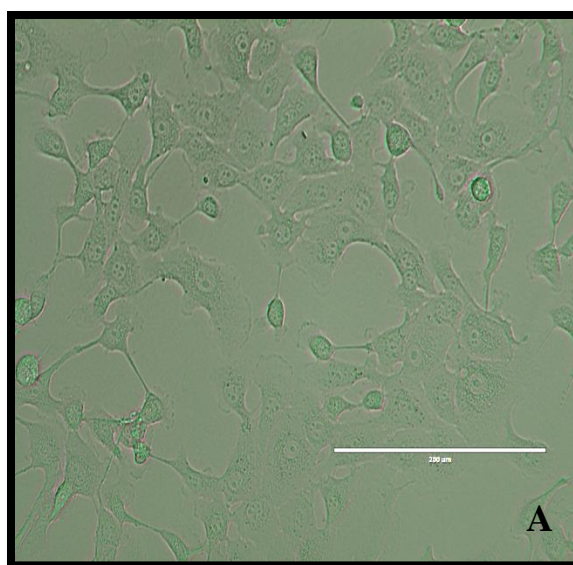


Figura 8. Fotografía de las lesiones en embrión de pollo inducidas por CpHV-1. **Figura A** representa MCA inoculada con PBS, no hay presencia de lesiones pustulares. **Figura B** representa MCA inoculada con CpHV-1, se observa la presencia de lesiones pustulares.

6.1.2 Cultivo celular

A partir de las lesiones obtenidas en el embrión de pollo, se realizó un inóculo y se procedió a replicar el virus en cultivo celular, utilizando línea celular MDBK. Para obtener un resultado cualitativo del avance del virus a través del tiempo, se realizó una cinética, tomando como criterio la aparición de los diferentes efectos citopáticos durante 5 días post infección (PI). Los resultados que se observaron a través de la cinética fueron diversos: a partir del día dos PI comenzaron a ser evidentes algunos efectos citopáticos (EFC), se pudo observar agrupamiento de las células y muerte celular en un 20% de la monocapa en contraste con el control negativo. Los EFC observados en los días posteriores fueron más evidentes extendiéndose a través de la monocapa, encontrando también cambios morfológicos en las células a partir del día tres, como vacuolización, sincitios y lisis celular llegando a un 90% en el monoestrato al día cinco PI. No hubo presencia de cambios aparentes en el control negativo a lo largo de esta cinética (Figura 9). Estos resultados indican la replicación del virus.



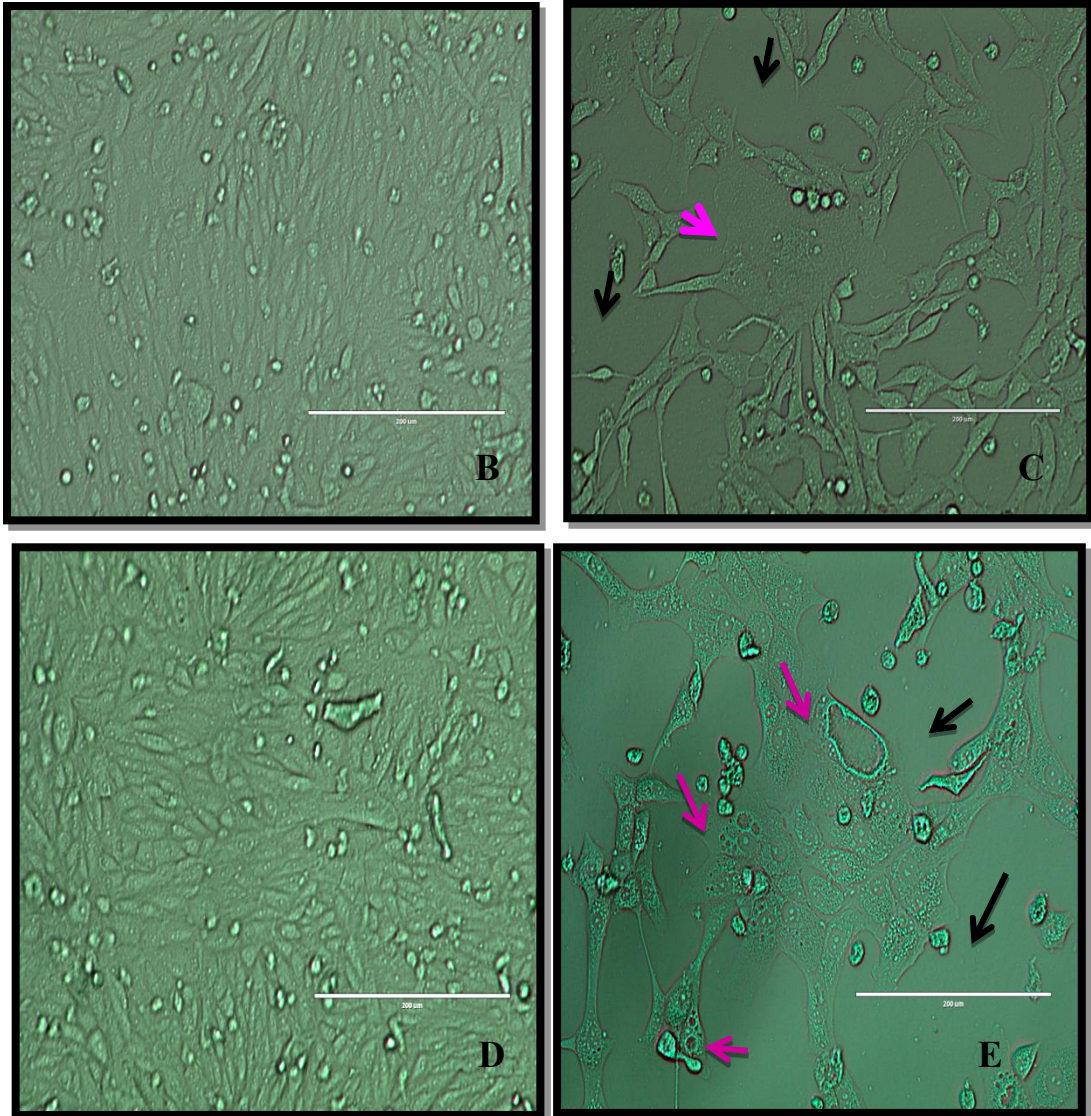


Figura 9. Cinética de infección con CphV-1 en células MDBK desde el día cero al día cinco visto en objetivo de 20X.

A. Células MDBK con una confluencia de 75% previo a la infección.

B. Control negativo de células MDBK sin infectar al día 2, no hay presencia de cambios aparentes **C.** Células MDBK con EFC observado al día 2 PI, inoculadas con CphV-1. Las flechas rosas indican la fusión de células y las flechas negras indican muerte celular.

D. Control negativo de células MDBK sin infectar al día 5, no hay presencia de cambios aparentes. **E.** Células MDBK con EFC observado al día 5 PI, inoculadas con CphV-1. Las flechas rosas indican cambios morfológicos en las células y las flechas negras indican muerte celular.

6.2 PRESENCIA DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES

6.2.1 Precipitación de CpHV-1 con PEG.

Una vez que se observaron los EFC sugerentes a CpHV-1 en el cultivo celular, hubo una ruptura de las células a través del sonicador para liberar las partículas virales, a partir de esto, se obtuvieron 10.73 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína, esto se precipitó con PEG al 8%, una vez concluido este proceso, se demostró la presencia de proteínas reconocidas por sueros de cabras previamente identificados como positivos a CpHV-1, así como también se utilizaron sueros negativos (Figura 10), en donde se observa el proceso de precipitación de las proteínas del CpHV1 en un gel SDS-PAGE al 12%, en el cual se colocaron en los diferentes carriles el sobrenadante de células sonicadas, precipitadas y del dializado al término de el proceso con el objetivo de verificar que las bandas de proteína de los diferentes pesos moleculares continuaran presentándose a través del proceso de precipitación. En el WB se observa la presencia de dos bandas inmunodominantes en pesos de 75 kDa y 55 kDa en los carriles en los que se depositó los pasos del precipitado, no así en el carril con control negativo el cual solo contenía MDBK sin infectar. También se puede observar que no hay presencia de bandas cuando se reveló con la mezcla de sueros negativos a CpHV-1.

Posteriormente se preparó la muestra para su resolución en geles 2D y realizar su caracterización.

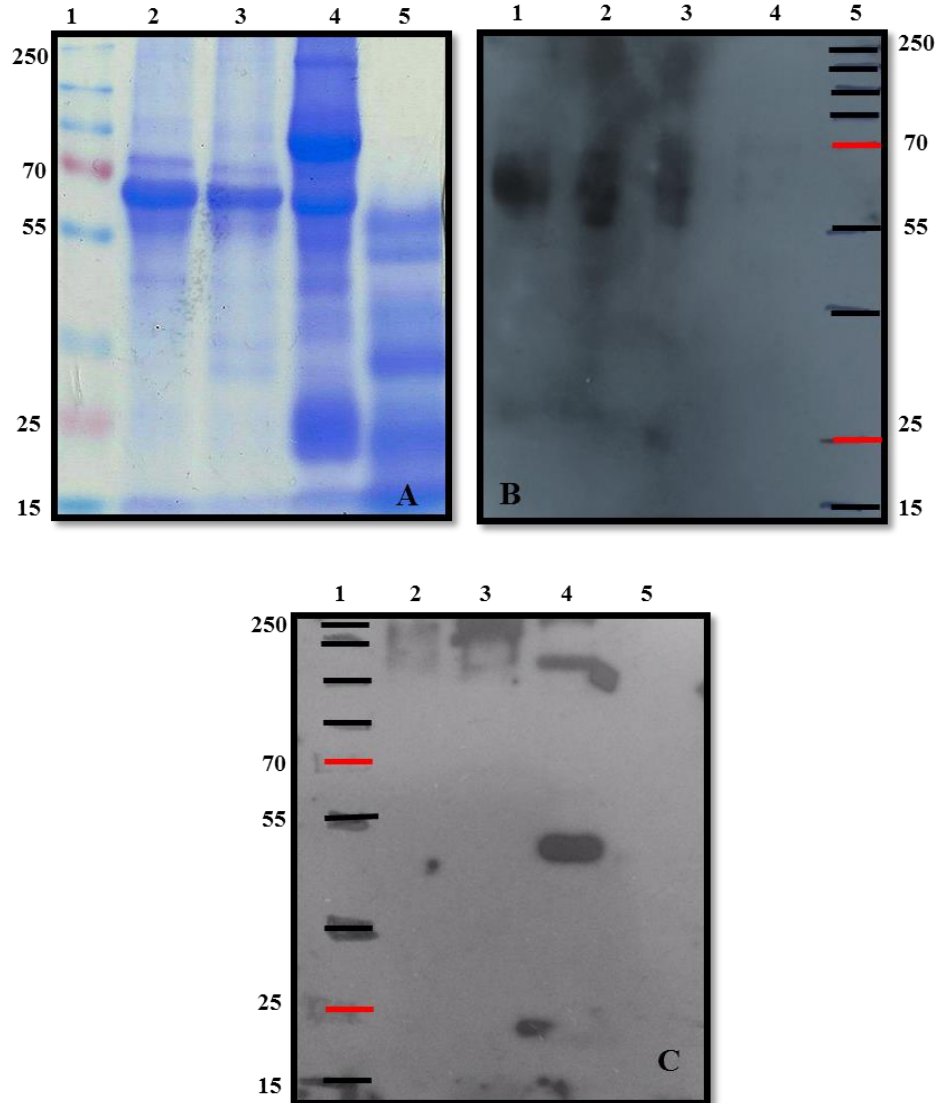


Figura 10. Proceso de purificación de las proteínas del CpHV-1.

A. SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomassie. **Carril 1** marcador de peso molecular, **Carril 2** Células infectadas con CpHV1, sonicadas, **Carril 3** Células precipitadas con PEG al 8%, **Carril 4** dializado **Carril 5** Células sin infectar (control negativo).

B. WB con sueros positivos a CpHV-1, se observan bandas inmunodominantes. **Carril 1** Células infectadas con CpHV1, sonicadas, **Carril 2** Células después de ser precipitadas con PEG al 8%, **Carril 3** Células después del dializado **Carril 4** Células sin infectar (control negativo). **Carril 5** marcador de peso molecular

C. WB con sueros negativos a CpHV-1 se observan bandas inmunodominantes en pesos no concordantes con las proteínas de interés. **Carril 1** marcador de peso molecular, **Carril 2** Células infectadas con CpHV1, sonicadas, **Carril 3** Células después de ser precipitadas con PEG al 8%, **Carril 4** Células después del dializado **Carril 5** Células sin infectar (control negativo).

6.3 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES

6.3.1 Caracterización de proteínas inmunodominantes de CpHV-1

El siguiente paso fue caracterizar las proteínas observadas en el gel de 1D, para lo cual se utilizó TCA como medio para concentrar la proteína obtenida después de sonicar. Este paso fue necesario debido a que para determinar las características fisicoquímicas de las proteínas se realizó un gel 2D SDS-PAGE al 10%, el cual requiere una gran cantidad de proteína (400 μ g) que no hubiera sido posible colocarla sin concentrarla debido al volumen que al final quedaba. Posteriormente se realizó Western Blot con sueros previamente identificados como positivos a CpHV-1, gracias a éste se confirmó la presencia de proteínas inmunodominantes, así también se logró caracterizar el punto isoeléctrico y peso molecular de dos puntos de proteínas inmunodominantes de interés debido a sus características y a la cantidad de proteína presente en el gel: la primera localizándose en un punto isoeléctrico (pI) de 7.3 con un peso de 97 kDa mientras que la segunda con un pI de 6.4 y un peso de 75 kDa (Figura 11). Como se observa en la imagen, existen diferentes puntos con potencial inmunodominante, por lo que el siguiente paso fue tratar de purificar y concentrar de manera selectiva a las proteínas inmunodominantes a través de la técnica de inmunoprecipitación.

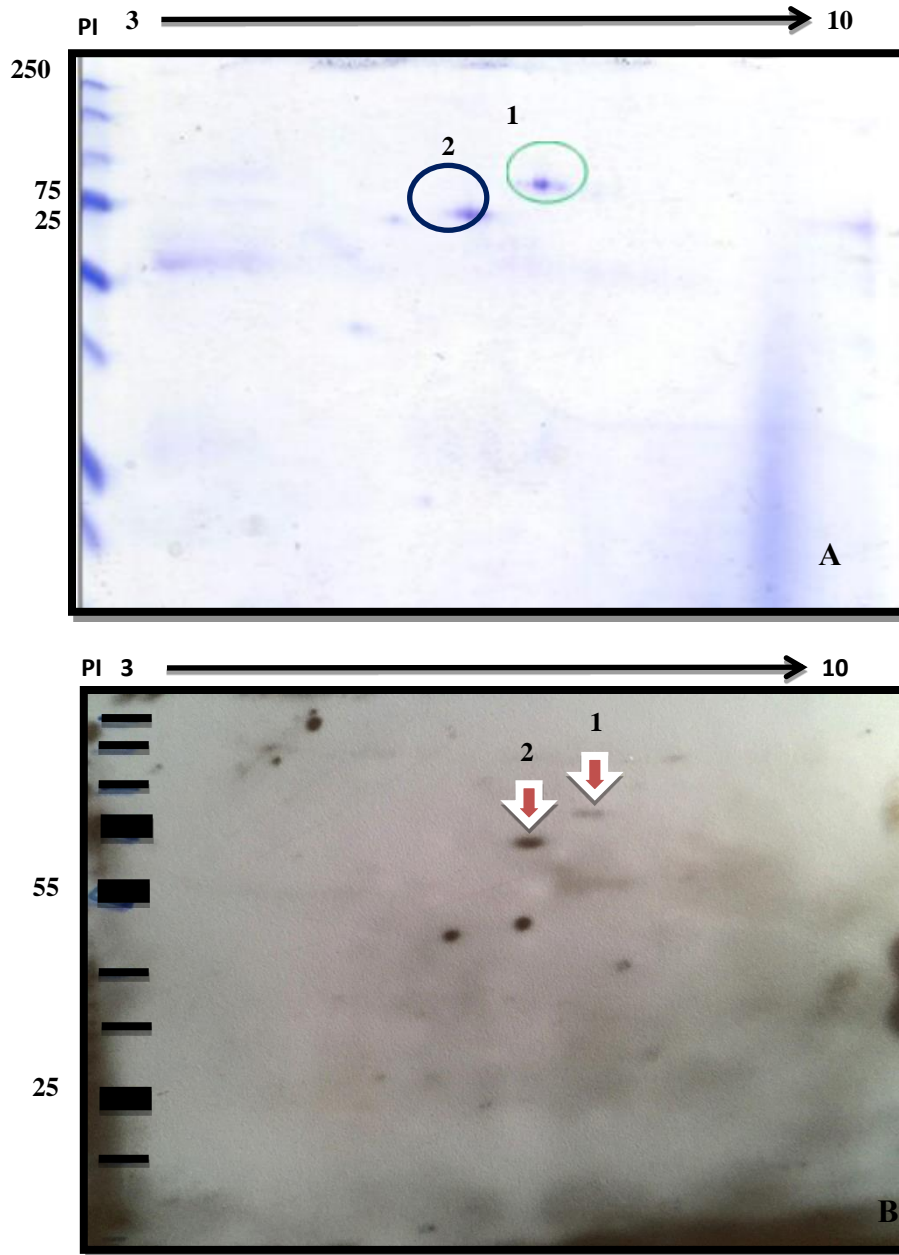


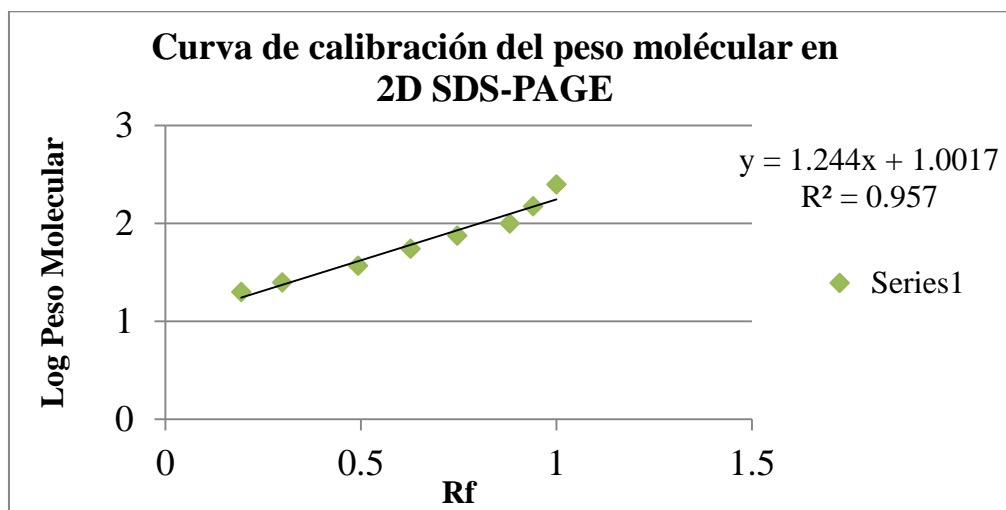
Figura 11. Se observa un gel 2D SDS-PAGE y Western Blot de las proteínas inmunodominantes.

A. gel 2D SDS-PAGE al 10% teñido con Azul de Coomassie.

B. membrana de PVDF, revelada por quimioluminiscencia. En ambas imágenes se observan dos puntos de proteínas, el primero en un pI de 7.3 con un peso de 97 kDa y el segundo de un pI de 6.4 y un peso de 75 kDa.

6.3.2 Determinación del peso molecular de las proteínas inmunodominantes

Se determinó el peso molecular de los dos puntos de proteínas inmunodominantes encontrados en el SDS-PAGE 2D, conforme a los cálculos obtenidos a partir de la regresión lineal (Fig. 12).



	Distancia de migración (cm)	Rf	Cálculo	PM
Punto 1	5.3	0.79104478	1.9857597	96.77 kDa
Punto 2	4.7	0.70149254	1.87435672	74.88 kDa

Figura 12. Determinación del peso molecular a través del método de regresión lineal, de los dos puntos de proteínas inmunodominantes encontradas en el gel SDS-PAGE

6.4 CONCENTRACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES OBTENIDAS

Como se mencionó anteriormente se evaluaron dos métodos para concentrar las proteínas inmunodominantes, y de esta manera utilizar menor volumen de muestra manteniendo la concentración de μg requerida para los geles, y así en un futuro utilizarlas como un antígeno en distintas pruebas diagnósticas.

6.4.1 Inmunoprecipitación

Gracias a la técnica de inmunoprecipitación fue posible concentrar las proteínas inmunodominantes, debido a que las proteínas precipitadas con PEG 8% al tener una mayor similitud podrían arrojar falsos positivos. Se utilizaron sueros positivos a CpHV-1 que permitieron la inmunoprecipitación y a partir de esto se realizó un gel SDS-PAGE 1D al 10% y Western Blot con suero hiperinmune elaborado en trabajos anteriores, en donde se observaron dos bandas inmunodominantes, la primera en un peso de 155kDa y la segunda en un peso de 74 kDa (Figura 13).

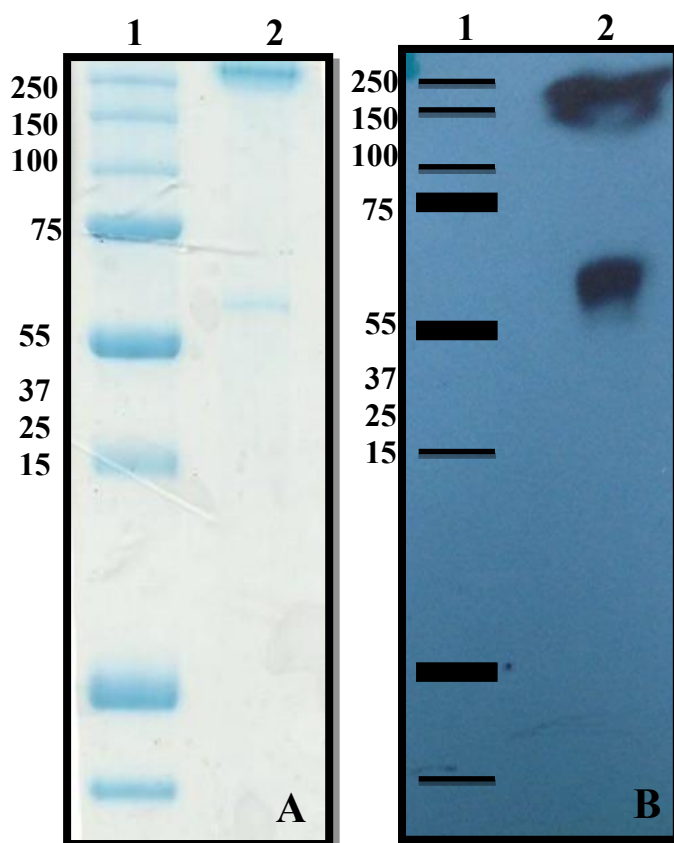


Figura 13. Proceso de concentración de las proteínas del CpHV-1. Presencia de proteínas inmunodominantes después de inmunoprecipitar.
A. SDS-PAGE al 10% teñido con azul comassie.
B. Membrana de PVDF revelada por quimioluminiscencia **Carril 1** Marcador de peso molecular, **Carril 2** Cultivo celular MDBK infectado con CpHV-1 previamente purificado e inmunoprecipitado. Se observan dos bandas, la primera en un peso de 155 kDa y la segunda en un peso de 74 kDa.

Después de esto se realizó un SDS-PAGE 2D al 10% a partir de la muestra inmunoprecipitada para obtener un perfil de resolución más exacto que en el de una diensión, en el WB se lograron identificar tres puntos de proteínas inmunodominantes, el primero en un pI 6.5 con un peso de 83 kDa, el segundo con un pI 5.5 con un peso de 65 kDa y el tercero de un pI de 5.5 y un peso de 51 kDa (Figura 14).

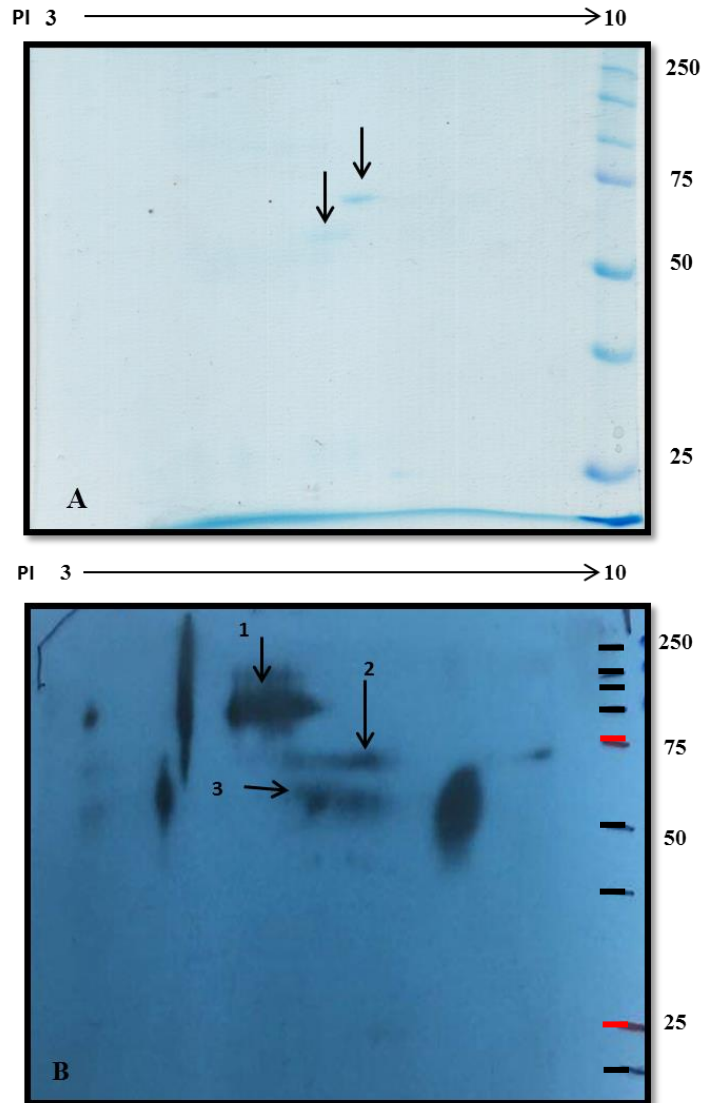


Figura 14. Gel 2D SDS-PAGE y Western Blot de las proteínas inmunodominantes después de inmunoprecipitar. **Figura A** gel 2D SDS-PAGE al 10% teñido con Azul de Coomassie. **Figura B** membrana de PVDF, revelada por quimioluminiscencia. Se observan tres puntos de proteínas inmunodominantes, el primero en un pI 6.5 con un peso de 83 kDa, el segundo con un pI 5.5 con un peso de 74 kDa y el tercero de un pI de 5.5 y un peso de 55 kDa.

6.4.2 Ultracentrifugación

Otro método que se utilizó para concentrar las proteínas inmunodominantes fue la ultracentrifugación, después de este proceso se lograron recolectar dos bandas en el gradiente de 30% de sacarosa, y se resuspendieron con 200 μl de TN de acuerdo al protocolo antes descrito, al cuantificar estas bandas se obtuvieron 0.24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Esto se corrió en un gel SDS-PAGE 1D al 10% colocando en cada carril 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Sin embargo, por la cantidad de proteína obtenida no fue posible realizar un SDS-PAGE 2D.

En los resultados obtenidos a partir del SDS-PAGE 1D se observan tres bandas en los pesos de 75 kDa y en 54 kDa y la tercera en 30 kDa (Figura 15).

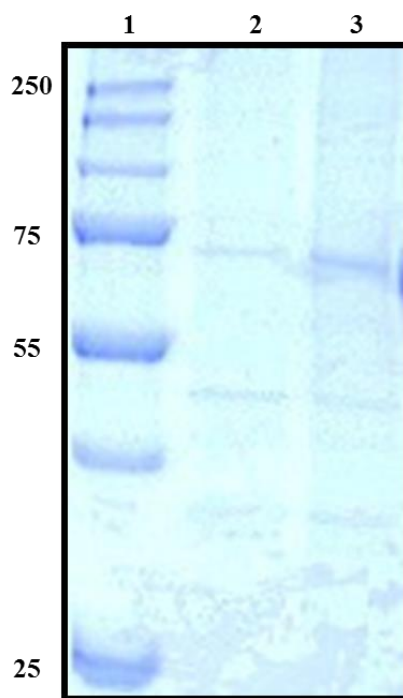


Figura 15. Proceso de concentración de las proteínas del CpHV-1. En la imagen se presenta un gel SDS-PAGE al 10% teñido con Azul de Coomassie correspondiente a la ultracentrifugación por gradientes de sacarosa al 30%. **Carril 1** marcador de peso molecular, **Carril 2** Fracción 2 correspondiente células MDBK después del proceso de ultracentrifugación **Carril 3** Fracción 3 muestra de células MDBK después del proceso de ultracentrifugación.

6.5 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS REPORTADAS A PARTIR DEL MÉTODO DE ESPECTOFOTOMETRÍA EN MASA.

De acuerdo a lo encontrado en los geles SDS-PAGE 2D descritos anteriormente, se mandaron a secuenciar dos puntos de proteínas inmunodominantes mediante la técnica de espectrofotometría de masas, provenientes de la imagen 4. Sin embargo, una de las limitantes de esta técnica fue la cercanía que presentaban los puntos de proteínas en su pI, debido a que no se contaba en ese momento con otro gradiente de isoelectroenfoque (4 a 7) para resolver mejor los puntos antes mencionados, además de que la cantidad de proteína que se logró obtener de cada punto era menor a lo requerido para este análisis. En el cuadro tres se muestran los péptidos obtenidos para cada proteína.

Péptidos obtenidos	
Proteína 1 97 kDa	TAVPNLCQLC V GK IVKGEADAM SLDGGFIYIA SSSD PDLTWNSLK TAGWNIPMGL LYSEIK YYGYTGAFR YLTAVANLR
Proteína 2 75 kDa	GLVLVA FSQYLQQCPF YEATL EK GLVL VAFSQYLQQC PFEEHVKLVN

Cuadro 3. Péptidos obtenidos a partir de la técnica de espectrofotometría de masas realizado en el IBT.

De acuerdo al peso y punto isoeléctrico de las proteínas enviadas a secuenciar, la primera podría concordar con la glicoproteína C, y la proteína dos con la fracción de 75 kDa de la glicoproteína B del CpHV-1, según lo reportado con la literatura (Cuadro 4).

Proteína	PM	pI	Reportado en la literatura
Proteína 1	97 kDa	7.3	gC 91 kDa pI 5.6
Proteína 2	75 kDa	6.4	gB 55 KDa pI 6.5

Cuadro 4. Resultados obtenidos determinantes para realizar los alineamientos específicos a las glicoproteínas del CpHV-1 de interés (Tempesta *et al.*, 2005).

Se buscó la alineación con estas glicoproteínas para conocer el porcentaje de identidad de cada una. En la figura 16 se muestran los distintos aminoácidos concordantes con las secuencias de las glicoproteínas reportadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

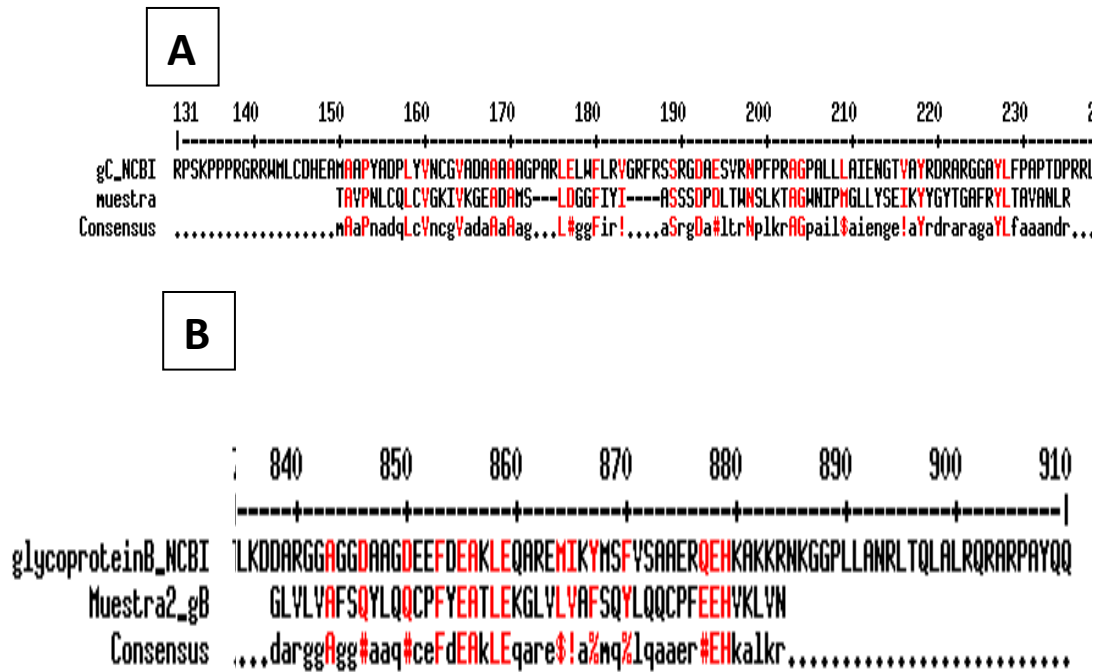


Fig. 16 Alineaciones de los péptidos con el programa MEGA®.
A. Secuencia de péptidos de la proteína inmunodominante 1.
B. Secuencia de péptidos de la proteína inmunodominante 2.

A partir de estos datos se muestran los porcentajes de identidad de los puntos de proteínas inmunodominantes secuenciados con la glicoproteína de interés (cuadro 5 y 6). Con respecto a la proteína uno se obtuvo un 27.8% de identidad con la glicoproteína C, mientras que, para la proteína dos se obtuvo un 34% de identidad con la glicoproteína B del CpHV-1.

Proteína 1	No. de aa totales	Glicoproteína	No. de aa concordantes	% identidad
	79	gC	22	27.8 %

Cuadro 5. Porcentajes de identidad de los puntos de proteínas inmunodominantes secuenciados a partir de la proteína uno.

Proteína 2	No. de aa totales	Glicoproteína	No. de aa concordantes	% identidad
	47	gB	16	34%

Cuadro 6. Porcentajes de identidad de los puntos de proteínas inmunodominantes secuenciados a partir de la proteína dos.

Con estos porcentajes de identidad no es posible asegurar que se refiere a estas proteínas proteínas del CpHV-1, sin embargo es necesario realizar un segundo estudio de secuenciación para obtener más información utilizando una tira de isoelectroenfoco de 4 a 7 para resolver adecuadamente estos puntos de proteínas inmunodominantes.

7. DISCUSIÓN

El principal aporte de este trabajo fue el lograr identificar tres proteínas inmunodominantes del CpHV-1 a partir de un purificado de células MDBK.

La primera proteína inmunodominante, que de acuerdo a las características físico químicas que se obtuvieron en el 2D SDS-PAGE, tiene un peso de 97 kDa con un pI de 7.3 podría concordar con lo reportado en la literatura para la gC que es de 92.78 kDa con un pI calculado de 5.64.

La gC es una de las proteínas más abundantes en la envoltura del virión y en la membrana plasmática de células infectadas. Está clasificada como no esencial pero juega un papel importante al inicio de la infección y en la salida del virión en la mayoría de los *Alfaherpesvirus*. En modelos *in vivo* con BoHV-1 ha demostrado ser importante para el mantenimiento de la eficiencia de la replicación viral en células hospederas, contribuyendo en la virulencia (Audonnet *et al.*, 2014), aunque hay reportes que indican que en BoHV-1 la función de la gC puede ser compensada por otras glicoproteínas como lo es la gB (WuDUNN y Spear, 1989, Whealy *et al.*, 1988), también se ha demostrado su papel en la replicación en cultivos de células infectadas Herpesvirus Equino tipo 1 (EHV-1), por lo que ha sido empleada en vacunas para esta enfermedad (Osterrieder, 1999).

Esta glicoproteína, al igual que la gB y la, gD presenta una diversidad genética importante (Tempesta *et al.*, 2004b), al estar involucrada en la modificación de la respuesta inmune del hospedero, por la unión a C3b del complemento (Kaashoek *et al.*, 1998), y en la regulación del neurotropismo en algunas áreas de la vía olfatoria (Chowdhury *et al.*, 2000b). La

secuencia de aminoácidos de la gC tiene diferencias significativas en la porción amino terminal de los virus BoHV-1 y BoHV-5 (Claus *et al.*, 2005).

En un análisis filogenético realizado con BoHV-1 se encontró que es de las más distantes, presentando un 9.2% de cercanía con el CpHV-1 (Majumder *et al.*, 2013).

Debido a las diferencias antes descritas, se podría considerar a la gC como un importante objetivo para utilizarse como antígeno para el diagnóstico y diferenciación del CpHV-1. Esta ya ha sido empleada para diferenciar entre géneros de la familia *Alfaherpesviridae*, (Hamano *et al.*, 2004). También se han utilizado anticuerpos monoclonales contra gC en la prueba de inmunofluorescencia (Ros y Belák, 1999, Thiry *et al.*, 2006).

En el caso de la segunda proteína inmunodominante encontrada en este trabajo, cuyo peso corresponde a 75 kDa y su punto isoeléctrico (pI) a un pH de 6.4, podría corresponder con una fracción de la glicoproteína B, un heterodímero de 130 kDa, que en un gel SDS-PAGE se separa en dos proteínas de 74 y de 55 kDa (Tempesta *et al.*, 2005, Ros y Belák, 2002, Tikoo *et al.*, 1995).

Distintos estudios han demostrado que la gB es de las glicoproteínas más conservadas y abundante entre los Alfaherpesvirus de rumiantes (Ros y Belák, 2002, Thiry *et al.*, 2007). Esta glicoproteína comparte distintos epítomos de BoHV-1 con CpHV-1 y puede causar una antigenicidad cruzada (Wellenberg *et al.*, 2001) y ha sido evaluada como inmunógeno en diferentes vacunas elaboradas para distintas especies de rumiantes (Cunha *et al.*, 2016).

A partir de la secuencia de esta glicoproteína se podrían sintetizar iniciadores para PCR o bien utilizarla como un antígeno para pruebas serológicas, ya que a pesar de que presenta

antigenicidad cruzada con BoHV-1, se podría seleccionar una región que permitiera distinguir entre estos virus, y detectar si otras cepas mexicanas comparten dicha secuencia.

En este trabajo también se logró identificar una tercera proteína inmunodominante en un 2D SDS-PAGE, a partir de la muestra inmunoprecipitada con sueros positivos a CpHV-1 y revelada con un suero hiperinmune de CpHV-1. Esta proteína solo pudo detectarse al usar una muestra inmunoprecipitada, lo que pudo deberse a que las glicoproteínas de interés se encuentran más purificadas y concentradas. Su peso fue de 51 kDa con un pI de 5.5, por lo que estar relacionada con la glicoproteína E (gE), la cual presenta un peso reportado en la literatura de 47-50 kDa y un pI calculado de 5.6. Una característica importante de esta glicoproteína es que presenta una alta inmunogenicidad y es la más variable entre las glicoproteínas de los herpesvirus. Esto se ha confirmado al analizar el gen US8 de la gE en el que se observa la divergencia genética entre el BoHV-1 y otros Alfa herpesvirus (Thiry *et al.*, 2007).

La gE está involucrada en la infección latente al tener interacción con las neuronas, así como para la expresión del potencial de virulencia en BoHV-5 (Chowdhury *et al.*, 2000a).

El ectodominio de la gE es más reactivo siendo un marcador de la infección en las células de mamíferos que permite establecer un diagnóstico efectivo entre las infecciones de Alfa herpesvirus en rumiantes (Bertolotti *et al.*, 2013, Wellenberg *et al.*, 2001).

La proteína detectada en el gel podría ser utilizada como blanco de purificación para demostrar si corresponde la glicoproteína E debido a su potencial para como un antígeno que permitiría diferenciar entre CpHV-1 y BoHV-1 así como otros Alfa herpesvirus de rumiantes y de esta manera poder utilizarlo en distintas pruebas diagnósticas.

Las secuencias obtenidas a partir de las dos proteínas enviadas, revelan un porcentaje de identidad muy bajo con las reportadas para CapHV-1. Esto pudo deberse a que no se logró resolverlas bien por la tira de pH utilizada, ya que los puntos de proteínas aparecían de manera continua impidiendo una muestra pura. Será necesario obtener una mejor resolución, que permita observar los puntos inmunodominantes con más distancia, para poder secuenciar las muestras con mejor calidad.

Los geles de SDS-PAGE 2D de este estudio sugieren la presencia de las distintas glicoproteínas ya que se observaron varios puntos consecutivos e inmunodominantes. Éstas pueden presentar un peso mayor al reportado en la literatura debido a que las glicoproteínas unen menos SDS que la mayoría de las proteínas, lo que provoca que la relación carga/tamaño sea menor y, por lo tanto, presentan menor movilidad electroforética y se comporten como si tuvieran mayor tamaño y pI similar debido a su glicosilación (Morales Sánchez y Gallo Ramírez, 2006). Con esta técnica es común ver glicofomas de las glicoproteínas separadas de manera horizontal en el gel en dos dimensiones, ya que pueden ser separadas simultáneamente y purificadas al estar libres de sales y otros contaminantes. Este fenómeno es causado por la diferencia del pI en las glicoproteínas y es común que se observe una variabilidad. También se cree que puede deberse a las diferencias de la sialilación de las distintas glicofomas de las proteínas (Packer *et al.*, 1996, Charlwood *et al.*, 2000, Hoffmann *et al.*, 1997, Wilson *et al.*, 2002). Una posible solución para resolver mejor las proteínas y obtener una secuencia específica es el utilizar un rango de isoelectroenfoco más específico. Debido a la similitud en las características fisicoquímicas de las glicoproteínas encontradas, se requeriría usar una tira de IPG en un pH de 4 a 7 para obtener

una mejor resolución de cada una, y por ende una muestra de muestra de mejor calidad para enviar a secuenciar.

Para el aislamiento del virus se utilizó la membrana corioalantoidea con la finalidad de replicarlo. Se observaron las lesiones pustulares de 3 cm, típicas de la familia *Herpesviridae*, que también han sido observadas por distintos autores utilizando muestras de semen y de lesiones genitales provenientes de una infección por BoHV-1 y del virus de Laringotraqueitis infecciosa en aves (Lowry *et al.*, 1971, Samrath *et al.*, 2016, Magouz, 2015).

La línea celular MDBK ha sido utilizada previamente para adaptar y cultivar el CpHV-1 y otros herpesvirus de rumiantes. En este estudio se utilizó esta línea debido a su origen y capacidad de mostrar el EFC característico, que se observó a partir del segundo pase post infección. El resultado del presente estudio concuerda con lo reportado en la literatura al observar redondeamiento, fusión celular, seguida de degeneración y desprendimiento de la monocapa a las 96 h PI (Samrath *et al.*, 2016, Bertolotti *et al.*, 2013, Keuser *et al.*, 2006, Tempesta *et al.*, 1999a). Los EFC vistos desde el segundo día en los primeros pases indican la adaptación del virus y al continuar con los pases se obtuvo un EFC constante en cada infección realizada a lo largo de este trabajo.

Para obtener virus con alta pureza y cantidad, se requiere su purificación. En este trabajo, el primer paso involucrado para ello fue la precipitación de las partículas virales. Este método se utiliza para grandes volúmenes en donde el virus puede ser concentrado y purificado simultáneamente (Pedro *et al.*, 2008), además de ser relativamente rápido y barato, no destruye al virus. Al utilizar PEG es posible obtener un precipitado a pH neutro y a altas concentraciones iónicas, como también en la ausencia de compuestos iónicos. Una limitante

de este procedimiento es el tiempo transcurrido para llevarse a cabo, ya que puede interferir con la cantidad/viabilidad de las partículas virales en la muestra. Sin embargo se han reportado numerosos estudios en donde obtienen de manera exitosa las partículas virales de plantas, bacterias y animales (Lewis y Metcalf, 1988, Staggemeier *et al.*, 2015, Leberman, 1966, Effio *et al.*, 2015, Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente, a pesar de que este método de purificación no es el óptimo debido a la heterogeneidad, permitió la identificación de dos bandas en pesos de 73 kDa y de 54 kDa, que concuerdan con los pesos reportados para la gB y gE, por lo que se pudo proseguir con la identificación de las diversas glicoproteínas encontradas en el presente estudio.

Para eliminar las impurezas que se coprecipitan con las partículas víricas debido a las propiedades biofísicas y/o bioquímicas similares se emplea un proceso secundario a la precipitación (Pedro *et al.*, 2008, Wolf y Reichl, 2011, Lawrence y Steward, 2010). En este trabajo se evaluaron dos diferentes técnicas como métodos para concentrar las glicoproteínas inmunodominantes. En el caso de la ultracentrifugación, la purificación del virus se logra en función de su coeficiente de sedimentación. Esta es una etapa de purificación final, que elimina el material de gradiente y concentra los virus (Pedro *et al.*, 2008). Sin embargo, para este método los rendimientos de recuperación fueron bajos, lo que dificultó su posterior análisis en un SDS-PAGE 2D, ya que el volumen obtenido fue insuficiente para someterlo a un gel de dos dimensiones. Por lo tanto, se puede concluir que, la ultracentrifugación requiere una gran cantidad de muestra. Además la naturaleza de la sacarosa al ser viscosa e hiperosmótica combinada con la fuerza generada durante la centrifugación a alta velocidad puede dañar los virus y conducir a la pérdida de infectividad que podría afectar futuros

experimentos. (Pedro *et al.*, 2008, Wolf y Reichl, 2011, Adriaenssens *et al.*, 2012, Podgornik *et al.*, 2013).

En el caso de la inmunoprecipitación como segunda técnica utilizada para concentrar el virus, que no solo ayudó a concentrar las proteínas virales, sino que también fue usado para aislar al CpHV-1 de entre miles de proteínas distintas provenientes del precipitado con PEG al 8%, ya que los antígenos pueden reaccionar con los anticuerpos en su conformación nativa. Esta técnica permitió concentrar las glicoproteínas a partir de un volumen relativamente grande (1-2 ml), conforme a lo reportado en la literatura, y de esta manera se pudo realizar un SDS-PAGE en una y dos dimensiones, lo que permitió proteínas inmunodominantes que no había sido posible identificarlas al no ser visibles en el gel anterior. Lo anterior se debe a que el grado de purificación y concentración de la muestra es mayor (Demi *et al.*, 2004, Thompson, 2004), haciéndola una técnica bastante sensible, ya que permite detectar pequeñas cantidades de proteínas (100 pg de proteína o 100 cpm/proteína) (Johansen K y L., 1998), obteniendo mejores resultados y precisos. Por lo anterior, en este trabajo se consideraría como la técnica de elección para futuros experimentos.

8. CONCLUSIONES

Se identificaron tres proteínas inmunodominantes del CpHV-1, reconocidas por sueros de diversos estados de la República Mexicana, previamente identificados como positivos mediante la prueba de ELISA. La primera localizándose en un punto isoeléctrico (pI) de 7.3 con un peso de 97 kDa, la segunda con un pI de 6.4 y un peso de 75 kDa y la tercera con un pI de 5.5 y un peso de 55 kDa. Estas podrían corresponder a la gC, la gB y la gE de CpHV-1.

Las secuencias obtenidas de dos de las proteínas encontradas, revelan un porcentaje de identidad muy bajo con las reportadas para CapHV-1, por lo que será necesario resolverlas mejor para volver a secuenciarlas.

9. PROSPECTIVAS

Se deberá continuar con la identificación de las tres proteínas inmunodominantes, a fin de determinar su identidad con las reportadas para el CpHV-1. Esto sería de gran utilidad ya que podrían ser utilizadas como antígenos purificados o como proteínas recombinantes para distintas pruebas diagnósticas (como ELISA o Luminex), con la ventaja de usar un aislado mexicano que pueda proporcionar un diagnóstico más certero y específico a la cepa de CpHV-1 que esté circulando en la República Mexicana, utilizando los sueros de los diferentes estados de la República previamente identificados y a su vez ampliando el margen del territorio al realizar muestreos en estados de la República distintos a los ya obtenidos.

Lo anterior también permitiría reducir los costos y acercaría el diagnóstico a los caprinocultores, lo que facilitaría la realización de estudios epidemiológicos de la enfermedad y daría la pauta para atenderla de manera oportuna y adecuada, previniendo abortos en las cabras, muertes en neonatos y las lesiones características del CpHV-1 que afectan de manera directa al caprinocultor.

10.REFERENCIAS

- ADRIAENSSENS, E. M., LEHMAN, S. M., VANDERSTEEGEN, K., VANDENHEUVEL, D., PHILIPPE, D. L., CORNELISSEN, A., CLOKIE, M. R., GARCÍA, A. J., DE PROFT, M. & MAES, M. 2012. CIM® monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles. *Virology*, 434: 265-270.
- AUDONNET, J. C., MINKE, J. M., OSTERRIEDER, N. & MA, G. 2014. Recombinant equine herpesvirus-1 vaccine containing mutated glycoprotein C and uses thereof. Google Patents.
- BABIUK, L. & TIKOO, S. 1996. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Veterinary microbiology*, 53: 31-42.
- BARANOWSKI, E., KEIL, G., LYAKU, J., RIJSEWIJK, F. A., VAN OIRSCHOT, J. T., PASTORET, P.-P. & THIRY, E. 1996. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. *Veterinary microbiology*, 53: 91-101.
- BERRIOS, P., MCKERCHER, D. & KNIGHT, H. 1975. Pathogenicity of a caprine herpesvirus. *American journal of veterinary research*, 36: 1763-1769.
- BERTOLOTTI, L., ROSAMILIA, A., PROFITI, M., BROCCHI, E., MASOERO, L., FRANCESCHI, V., TEMPESTA, M., DONOFRIO, G. & ROSATI, S. 2013. Characterization of caprine herpesvirus 1 (CpHV1) glycoprotein E and glycoprotein I ectodomains expressed in mammalian cells. *Veterinary microbiology*, 164: 222-228.
- BOGUTH, G., HARDER, A., SCHEIBE, B., WILDGRUBER, R. & WEISS, W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21: 1037-1053.
- BRATANICH, A. & JONES, C. J. 1992. Localization of cis-acting sequences in the latency-related promoter of bovine herpesvirus 1 which are regulated by neuronal cell type factors and immediate-early genes. *Journal of virology*, 66: 6099-6106.
- BUONAVOGLIA, C., TEMPESTA, M., CAVALLI, A., VOIGT, V., BUONAVOGLIA, D., CONSERVA, A. & CORRENTE, M. 1996. Reactivation of caprine herpesvirus 1 in

- latently infected goats. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 19: 275-281.
- CANDANOSA, A. I. E., SIERRA GARCÍA, M., SÁNCHEZ CERVANTES, A., SALAS GARRIDO, G., MÉNDEZ BERNAL, A., COBOS MARÍN, L. & ÁLVAREZ RAMÍREZ, L. 2011. Vulvovaginitis y balanopostitis pustular sugerente a herpesvirus caprino-1 en cabras (Querétaro, México). *Veterinaria México*, 42: 233-243.
- CLAUS, M. P., ALFIERI, A. F., FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V., WOSIACKI, S. R., MÉDICI, K. C. & ALFIERI, A. A. 2005. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *Journal of virological methods*, 128: 183-188.
- COBOS MARÍN, L. 2015. *RE: Comunicación personal*
- CUNHA, C. W., TAUS, N. S., DEWALS, B. G., VANDERPLASSCHEN, A., KNOWLES, D. P. & LI, H. 2016. Replacement of Glycoprotein B in Alcelaphine Herpesvirus 1 by Its Ovine Herpesvirus 2 Homolog: Implications in Vaccine Development for Sheep-Associated Malignant Catarrhal Fever. *mSphere*, 1: e00108-16.
- CHARLWOOD, J., SKEHEL, J. M. & CAMILLERI, P. 2000. Analysis of N-linked oligosaccharides released from glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 284: 49-59.
- CHOWDHURY, S., LEE, B., OZKUL, A. & WEISS, M. 2000a. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *Journal of virology*, 74: 2094-2106.
- CHOWDHURY, S. I., LEE, B. J., ONDERCI, M., WEISS, M. L. & MOSIER, D. 2000b. Neurovirulence of glycoprotein C (gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. *Journal of neurovirology*, 6: 284-295.
- DAVISON, A. J., EBERLE, R., EHLERS, B., HAYWARD, G. S., MCGEOCH, D. J., MINSON, A. C., PELLETT, P. E., ROIZMAN, B., STUDDERT, M. J. & THIRY, E. 2009. The order herpesvirales. *Archives of virology*, 154: 171-177.
- DEL CASTILLO CALVA, E. & GÓMEZ ARROYO, F. 2016. *Manual de trabajo del Laboratorio de Virología*, Ciudad de México, FMVZ UNAM.

- DEMI, L., WILD, J. & WAGNER, R. 2004. Virus-like Particles. *Molecular diagnosis of infectious diseases*: 133.
- EFFIO, C. L., WENGER, L., ÖTES, O., OELMEIER, S. A., KNEUSEL, R. & HUBBUCH, J. 2015. Downstream processing of virus-like particles: Single-stage and multi-stage aqueous two-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1383: 35-46.
- ELIA, G., TARSITANO, E., CAMERO, M., BELLACICCO, A. L., BUONAVOGLIA, D., CAMPOLO, M., DECARO, N., THIRY, J. & TEMPESTA, M. 2008. Development of a real-time PCR for the detection and quantitation of caprine herpesvirus 1 in goats. *Journal of virological methods*, 148: 155-160.
- ENGELS, M. & ACKERMANN, M. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary microbiology*, 53: 3-15.
- FEHLER, F., HERRMANN, J., SAALMÜLLER, A., METTENLEITER, T. & KEIL, G. 1992. Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1-expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant. *Journal of virology*, 66: 831-839.
- FENNER, F., GIBBS, E. P. J., MURPHY, F., STUDDERT, M. & WHITE, D. 1992. *Virología veterinaria*, Acribia.
- FIRA, F. I. E. R. C. L. A. 1999. Oportunidades de Desarrollo en la Industria de la Leche y Carne de Cabra en México. *In: FIRA (ed.)*. México: Boletín Informativo Número 13.
- FLINT, S., ENQUIST, L., RACANIELLO, V., SKALKA, A., BARNUM, D. R. & DE EVALUACIÓN, E. 2000. *Principles of Virology: Molecular Biology, Patogenesis and*, ASM Press. Washington DC USA.
- FRIEDMAN, H. M., COHEN, G. H., EISENBERG, R. J., SEIDEL, C. A. & CINES, D. B. 1984. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells.
- GARCÍA HERNÁNDEZ, M. E. 2013. *Análisis de un aislamiento por PCR y determinación de anticuerpos por ELISA de Herpesvirus en cabras de la República Mexicana*. Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México
- GONZÁLEZ DELGADO, L. S. 2012. *Aislamiento, identificación molecular y serológica del Herpesvirus Caprino tipo 1 en un hato ubicado en Tequisquiapan, Querétaro*,

México. Licenciatura Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México

- GREWAL, A. & WELLS, R. 1986. Vulvovaginitis of goats due to a herpesvirus. *Australian veterinary journal*, 63: 79-82.
- GRIFFIN, A. 1991. The nucleotide sequence of the glycoprotein gB gene of infectious laryngotracheitis virus: analysis and evolutionary relationship to the homologous gene from other herpesviruses. *J. Gen. Virol*, 72: 393-398.
- GUERRERO-RODRÍGUEZ, J., MANUEL-CABRERA, C. A., PALOMINO-HERMOSILLO, Y. A., DELGADO-GUZMÁN, P. G., ESCOTO-DELGADILLO, M., SILVA-ROSALES, L., HERRERA-RODRÍGUEZ, S. E., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C. & GUTIÉRREZ-ORTEGA, A. 2014. Virus-Like Particles from Escherichia coli-Derived Untagged Papaya Ringspot Virus Capsid Protein Purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography Enhance the Antibody Response Against a Soluble Antigen. *Molecular biotechnology*, 56: 1110-1120.
- HAMANO, M., MAEDA, K., MIZUKOSHI, F., MOCHIZUKI, M., TOHYA, Y., AKASHI, H. & KAI, K. 2004. Genetic rearrangements in the gC gene of the feline herpesvirus type 1. *Virus genes*, 28: 55-60.
- HEWITT, E. W. 2003. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, 110: 163-169.
- HOFFMANN, A., NIMTZ, M. & CONRADT, H. S. 1997. Molecular characterization of β -trace protein in human serum and urine: a potential diagnostic marker for renal diseases. *Glycobiology*, 7: 499-506.
- HOMER, G., HUNTER, R. & DAY, A. 1982. An outbreak of vulvovaginitis in goats caused by a caprine herpesvirus. *New Zealand Veterinary Journal*, 30: 150-152.
- HUEMER, H., LARCHER, C., DIERICH, M. & FALKE, D. 1992. Factors influencing the interaction of herpes simplex virus glycoprotein C with the third component of complement. *Archives of virology*, 127: 291-303.
- JOHANSEN K & L., S. 1998. Immunoprecipitation, Methods Mol Med. *PubMed*.
- JONJIĆ, S., BABIĆ, M., POLIĆ, B. & KRMPOTIĆ, A. 2008. Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Current opinion in immunology*, 20: 30-38.

- KAASHOEK, M., RIJSEWIJK, F., RUULS, R., KELI, G., THIRY, E., PASTORET, P.-P. & VAN OIRSCHOT, J. 1998. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine*, 16: 802-809.
- KENT, J. R., KANG, W., MILLER, C. G. & FRASER, N. W. 2003. Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *Journal of neurovirology*, 9: 285-290.
- KEUSER, V., DETRY, B., THIRY, J., DE FAYS, K., SCHYNTS, F., PASTORET, P.-P., VANDERPLASSCHEN, A. & THIRY, E. 2006. Characterization of caprine herpesvirus 1 glycoprotein D gene and its translation product. *Virus research*, 115: 112-121.
- KEUSER, V., GOGEV, S., SCHYNTS, F. & THIRY, E. 2002. Demonstration of generalized infection with caprine herpesvirus 1 diagnosed in an aborted caprine fetus by PCR. *Veterinary research communications*, 26: 221-226.
- KEUSER, V., SCHYNTS, F., DETRY, B., COLLARD, A., ROBERT, B., VANDERPLASSCHEN, A., PASTORET, P.-P. & THIRY, E. 2004. Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Journal of clinical microbiology*, 42: 1228-1235.
- KÖNIG, P., GIESOW, K. & KEIL, G. M. 2002. Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells. *Veterinary microbiology*, 86: 37-49.
- LAWRENCE, J. E. & STEWARD, G. F. 2010. Purification of viruses by centrifugation. *Manual of aquatic viral ecology. ASLO*: 166-181.
- LEBERMAN, R. 1966. The isolation of plant viruses by means of "simple" coacervates. *Virology*, 30: 341-347.
- LEMAIRE, M., SCHYNTS, F., MEYER, G. & THIRY, E. 1999. Antibody response to glycoprotein E after bovine herpesvirus type 1 infection in passively immunised, glycoprotein E-negative calves. *The Veterinary Record*, 144: 172-176.
- LEWIS, G. D. & METCALF, T. G. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster,

- water, and sediment samples. *Applied and environmental microbiology*, 54: 1983-1988.
- LI, Y., BABIUK, L. & LIANG, X. 1995. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. *Journal of virology*, 69: 4758-4768.
- LI, Y., LIANG, X., ATTAH-POKU, S. & BABIUK, L. 1996. Glycoprotein Bb, the N-terminal subunit of bovine herpesvirus 1 gB, can bind to heparan sulfate on the surfaces of Madin-Darby bovine kidney cells. *Journal of virology*, 70: 2032-2037.
- LIPÍŃSKA, A. D., KOPPERS-LALIC, D., RYCHŁOWSKI, M., ADMIRAAL, P., RIJSEWIJK, F. A., BIEŃKOWSKA-SZEWCZYK, K. & WIERTZ, E. J. 2006. Bovine herpesvirus 1 UL49. 5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *Journal of virology*, 80: 5822-5832.
- LOWRY, S. P., MELNICK, J. & RAWLS, W. 1971. Investigation of plaque formation in chick embryo cells as a biological marker for distinguishing herpes virus type 2 from type 1. *Journal of General Virology*, 10: 1-9.
- LUBINSKI, J. M., JIANG, M., HOOK, L., CHANG, Y., SARVER, C., MASTELLOS, D., LAMBRIS, J. D., COHEN, G. H., EISENBERG, R. J. & FRIEDMAN, H. M. 2002. Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo. *Journal of virology*, 76: 9232-9241.
- LUBINSKI, J. M., WANG, L., SOULIKA, A. M., BURGER, R., WETSEL, R. A., COLTEN, H., COHEN, G. H., EISENBERG, R. J., LAMBRIS, J. D. & FRIEDMAN, H. M. 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC mediates immune evasion in vivo. *Journal of virology*, 72: 8257-8263.
- LLANOS SALINAS, S. P. 2012b. *Diagnóstico de Herpes Caprino CpHV-1 por medio de la técnica de inmunohistoquímica*. Licenciatura Tesis para obtener el título de médica veterinaria zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México
- MAGOUZ, A. 2015. Isolation and Molecular Characterization of Infectious Laryngotracheitis Virus from Naturally Infected Layer Chicken Flocks in Egypt.

- MAJUMDER, S., PANDEY, A. & RAMAKRISHNAN, M. 2013. Genetic characterization of complete open reading frame of glycoprotein C gene of bovine herpesvirus. *Veterinary World*, 6: 897-900.
- MARINARO, M., BELLACICCO, A. L., TARSITANO, E., CAMERO, M., COLAO, V., TEMPESTA, M. & BUONAVOGLIA, C. 2010. Detection of Caprine Herpesvirus 1-Specific Antibodies in Goat Sera Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Serum Neutralization Test. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 22: 245-248.
- MELLADO, M. 2008. Técnicas para el manejo reproductivo de las cabras en agostadero. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 9: 47-63.
- METTLER, F., ENGELS, M., WILD, P. & BIVETTI, A. 1979. Herpesvirus-infektion bei zicklein in der Schweiz. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*.
- MILLER, J. & VAN DER MAATEN, M. 1984. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *American journal of veterinary research*, 45: 790-794.
- MORALES SÁNCHEZ, D. & GALLO RAMÍREZ, L. E. 2006. Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. Morelos.
- OSTERRIEDER, N. 1999. Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus research*, 59: 165-177.
- PACKER, N. H., WILKINS, M. R., GOLAZ, O., LAWSON, M. A., GOOLEY, A. A., HOCHSTRASSER, D. F., REDMOND, J. W. & WILLIAMS, K. L. 1996. Characterization of human plasma glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Nature Biotechnology*, 14: 66-70.
- PEDRO, L., SOARES, S. S. & FERREIRA, G. N. 2008. Purification of bionanoparticles. *Chemical engineering & technology*, 31: 815-825.
- PELLETT, R. 2007. The family Herpesviridae: A brief introduction. *Fields Virology*, eds Knipe DM, et al. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia), 5th Ed, Vol2, pp2479-2500.
- PIPER, K., FITZGERALD, C., FICORILLI, N. & STUDDERT, M. 2008. Isolation of caprine herpesvirus 1 from a major outbreak of infectious pustular vulvovaginitis in goats. *Australian veterinary journal*, 86: 136-138.

- PODGORNIK, A., YAMAMOTO, S., PETERKA, M. & KRAJNC, N. L. 2013. Fast separation of large biomolecules using short monolithic columns. *Journal of Chromatography B*, 927: 80-89.
- ROIZMANN, B., DESROSIERS, R., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A. & STUDDERT, M. 1992. The family Herpesviridae: an update. *Archives of virology*, 123: 425-449.
- ROMERO CABELLO, R. 2007. Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. *Raúl. 3ª Edición. Barcelona: Médica Panamericana.*
- ROPERTO, F., PRATELLI, A., GUARINO, G., AMBROSIO, V., TEMPESTA, M., GALATI, P., IOVANE, G. & BUONAVOGLIA, C. 2000. Natural caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) infection in kids. *Journal of comparative pathology*, 122: 298-302.
- ROS, C. & BELÁK, S. 1999. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *Journal of clinical microbiology*, 37: 1247-1253.
- ROS, C. & BELÁK, S. 2002. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes*, 24: 99-105.
- ROS, C., RIQUELME, M., FORSLUND, K. Ö. & BELAK, S. 1999. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *Journal of virological methods*, 83: 55-65.
- RUE, C. A. & RYAN, P. 2003. A role for glycoprotein C in pseudorabies virus entry that is independent of virus attachment to heparan sulfate and which involves the actin cytoskeleton. *Virology*, 307: 12-21.
- RUÍZ JULIÁN, J. V. 2008. Latencia del herpesvirus bovino-1: El papel de los transcritos relacionados con latencia (RL). *Acta biol. Colomb*, 13: 3-22.
- SAGARPA., S. D. A. G. P. Y. A. 2010. *In: SAGARPA (ed.)*.
- SAITO, J., GRIBBLE, D., BERRIOS, P., KNIGHT, H. & MCKERCHER, D. 1974. New herpesvirus isolate from goats: preliminary report. *American journal of veterinary research*.

- SAMRATH, D., SHAKYA, S., RAWAT, N., GILHARE, V. R. & SINGH, F. 2016. Isolation and adaptation of bovine herpes virus Type 1 in embryonated chicken eggs and in Madin–Darby bovine kidney cell line. *Veterinary world*, 9: 222.
- SCHR, C. & KEIL, G. 1999. Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH (W450) and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *Journal of general virology*, 80: 57-61.
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, G., DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. 2013. Programa de Desarrollo de Capacidades, Innovación Tecnológica y Extensionismo Rural. In: SAGARPA (ed.) 2013 ed.
- SERRA HARTMANN, X., PIÑOL RIBAS, J. & QUEROL MURILLO, E. 2006. *Expresión de la glicoproteína E del BoHV-1 en Escherichia coli*, Universitat Autònoma de Barcelona.
- SIAP., S. D. I. A. Y. P. D. L. S. 2011. Principales estados productores de leche y carne caprina. SAGARPA
- SMITH, K. 1997. Herpesviral abortion in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 153: 253-268.
- SMITH, M. C. & SHERMAN, D. M. 2009. Reproductive system. *Goat Medicine, Second Edition*: 571-645.
- STAGGEMEIER, R., BORTOLUZZI, M., DA SILVA HECK, T. M., DA SILVA, T., SPILKI, F. R. & DE MATOS ALMEIDA, S. E. 2015. Molecular detection of human adenovirus in sediment using a direct detection method compared to the classical polyethylene glycol precipitation. *Journal of virological methods*, 213: 65-67.
- TARIGAN, S., WEBB, R. & KIRKLAND, D. 1987. Caprine herpesvirus from balanoposthitis. *Australian veterinary journal*, 64: 321-321.
- TEMPESTA, M., CAMERO, M., SCIORSCI, R., GRECO, G., MINOIA, R., MARTELLA, V., PRATELLI, A. & BUONAVOGLIA, C. 2004a. Experimental infection of goats at different stages of pregnancy with caprine herpesvirus 1. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27: 25-32.
- TEMPESTA, M., GRECO, G., TARSITANO, E., THIRY, J., CAMERO, M., DECARO, N., MARTELLA, V., THIRY, E. & BUONAVOGLIA, C. 2005. Analysis of antibody response in goats to caprine herpesvirus 1. *Biologicals*, 33: 283-287.

- TEMPESTA, M., PRATELLI, A., CORRENTE, M. & BUONAVOGLIA, C. 1999a. A preliminary study on the pathogenicity of a strain of caprine herpesvirus-1. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 22: 137-143.
- TEMPESTA, M., PRATELLI, A., GRECO, G., MARTELLA, V. & BUONAVOGLIA, C. 1999b. Detection of caprine herpesvirus 1 in sacral ganglia of latently infected goats by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 37: 1598-1599.
- TEMPESTA, M., TARSITANO, E., CAMERO, M., GRECO, G., DECARO, N., ELIA, G., TERIO, V. & BUONAVOGLIA, C. 2004b. Short sequence repeats (ssr) in the glycoprotein c gene of caprine herpesvirus type 1 (CpHV-1). *Proc. II Eur. Virol. Cong.*
- THIRY, J., KEUSER, V., MUYLKENS, B., MEURENS, F., GOGEV, S., VANDERPLASSCHEN, A. & THIRY, E. 2006. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Veterinary research*, 37: 169-190.
- THIRY, J., SAEGERMAN, C., CHARTIER, C., MERCIER, P., KEUSER, V. & THIRY, E. 2008. Serological evidence of caprine herpesvirus 1 infection in Mediterranean France. *Veterinary microbiology*, 128: 261-268.
- THIRY, J. & THIRY, E. 2008. El Herpesvirus Caprino es altamente prevalente. *Mundo Ganadero*: 32-35.
- THIRY, J., WIDÉN, F., GRÉGOIRE, F., LINDEN, A., BELÁK, S. & THIRY, E. 2007. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BMC veterinary research*, 3: 1.
- THOMPSON, S. 2004. Immunoprecipitation and Blotting. *Molecular diagnosis of infectious diseases*: 33-45.
- TIKOO, S. K., CAMPOS, M. & BABIUK, L. A. 1995. Bovine Herpesvirus 1 (Bhv-1 (: Biology, Pathogenesis, and Control. *Advances in virus research*, 45: 191-223.
- WELLENBERG, G., MARS, M. & VAN OIRSCHOT, J. 2001. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. *Veterinary microbiology*, 78: 79-84.
- WHEALY, M., BAUMEISTER, K., ROBBINS, A. & ENQUIST, L. 1988. A herpesvirus vector for expression of glycosylated membrane antigens: fusion proteins of

- pseudorabies virus gIII and human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Journal of virology*, 62: 4185-4194.
- WILSON, N. L., SCHULZ, B. L., KARLSSON, N. G. & PACKER, N. H. 2002. Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *Journal of proteome research*, 1: 521-529.
- WITTELS, M. & SPEAR, P. G. 1991. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus research*, 18: 271-290.
- WOLF, M. W. & REICHL, U. 2011. Downstream processing of cell culture-derived virus particles. *Expert review of vaccines*, 10: 1451-1475.
- WUDUNN, D. & SPEAR, P. G. 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *Journal of Virology*, 63: 52-58.
- ZUO, J. & ROWE, M. 2012. Herpesviruses placating the unwilling host: manipulation of the MHC class II antigen presentation pathway. *Viruses*, 4: 1335-1353.

11. ANEXOS

11.1 Soluciones y reactivos

Solución 1. *Solución amortiguadora Tris ácido clorhídrico EDTA (TNE).*

Reactivo	Concentración
Tris-HCl	50 mM
NaCl	0.1 M
EDTA	10 mM

Diluir con agua destilada. Se requiere un pH 7.5

Solución 2. *Solución Amortiguadora Tris Ácido clorhídrico (TN)*

Reactivo	Concentración
NaCl	0.15 M
Tris	0.05 M

Diluir con agua destilada.

Solución 3. *Buffer Amortiguador del gel separador*

Reactivo	Concentración	Cantidad
Tris Base	1.5 M	90.828 g
Agua Destilada	---	500 ml

Agregar el reactivo en 400 ml y después aforar a 500 ml. Ajustar el pH a 8.8.

Solución 4. Buffer Amortiguador del gel concentrador

Reactivo	Concentración	Cantidad
Tris HCl	0.5 M	19.7 g
Agua destilada	---	250 ml

Iniciar con un volumen de 200 ml y aforar a 250 ml. Ajustar pH a 6.8.

Solución 5. Persulfato de amonio al 10%.

Diluir 0.1 g en 1 ml de Agua destilada.

Preparar antes de usarse, si se mantiene en refrigeración tendrá una caducidad de 1 semana si se mantiene a -20 °C tendrá una caducidad de 3 meses.

Solución 6. SDS al 10%

Diluir 0.1 g en 1 ml de Agua destilada.

Preparar antes de usarse, y mantener a temperatura ambiente.

Solución 7. Buffer de corrida

Reactivo	Concentración	Cantidad
Glicina	0.192 M	14.4 g
Tris Base	0.025 M	3 g
SDS	0.1%	1 g o 10 ml al 10%

Agregar los componentes en 300 ml y después aforar a 1 litro, ajustar el pH a 8.3.

Solución 8. Buffer de Transferencia

Reactivo	Cantidad
Tris Base	4.8 g
Glicina	23 g
Metanol	320 ml
SDS	100 µl al 10%
Agua destilada	1.6 L

Agregar los componentes en 300 ml de agua destilada y después aforar. No ajustar el pH.

Solución 9. Solución Amortiguadora de Fosfatos Salino (PBS) 10X.

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	80 g
Cloruro de Potasio (KCl)	2 g
Fosfato de potasio monobásico	1.2 g
Fosfato de Sodio Dibásico	9.1 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Agregar los reactivos en este orden en 300 ml y después aforar. Ajustar pH a 7 a 7.4.

Solución 10. Buffer de Carga Laemmli 2X

Reactivo	Cantidad
Agua Desionizada	4 ml
Tris-HCl pH 6.8	1ml
Glicerol	0.8 ml

SDS 10%	1.6 ml
β-mercaptoetanol	0.4 ml
Azul de bromofenol 0.1% w/vol	0.2 g

Disolver primero el colorante en el agua, posteriormente adicionar los otros sustratos y por último el β -mercaptoetanol. Prepararlo en la campana de extracción.

Solución 11. Tinción de Azul de Coomassie 0.2%

Reactivo	Cantidad
Azul de Coomassie	2 g
Metanol	500 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua destilada	400 ml

Se disuelve primero el colorante con el metanol, una vez disuelto se le adiciona el ácido acético y el agua, agitar durante 30 minutos y filtrar en papel whatman No.1.

Solución 12. Solución Destiñidora de geles de poliacrilamida

Reactivo	Cantidad
Metanol	100 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua Destilada	800 ml

Solución 13. Solución de lavado del Anticuerpo secundario.

Reactivo	Concentración	Cantidad
PBS	1X	500 ml
Cloruro de Sodio (NaCl)	1 M	29.22 g
Tween 20	1%	0.5 ml

Solución 14. Solución de bloqueo al 3%

Reactivo	Cantidad
Leche descremada Svelty®	0.45 g
Agua Destilada	15 ml