



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ASOCIACIÓN ENTRE EL CUADRO CLÍNICO Y LA REGIÓN PX DEL VIRUS DE
LEUCEMIA BOVINA.

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO:
DE MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
NELI MONTERO MACHUCA
TUTOR:
DR. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ - FES CUAUTILÁN

COMITÉ TUTOR:
DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA - FMVZ
DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA - FES CUAUTILÁN

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, JULIO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mis padres y hermanos por todo su amor, por su compañía a lo largo de toda mi vida y su apoyo incondicional en todo lo que hago gracias.

A Carolina y Eduardo gracias chicos por todo el tiempo concedido durante este proceso, por ser mi alegría de vivir y mi motivo para ser mejor cada día.

A Lalo por compartir tu vida conmigo por todo lo bueno y lo malo porque sin duda de todo se aprende.

Al Dr. Hugo gracias por abrirme las puertas desde el día uno, por todo lo aprendido y por su paciencia durante todo este tiempo.

Al Dr. Tortora gracias por todo su apoyo, por sus consejos y por ser un ejemplo a seguir.

A la bandita MC y a todos en el laboratorio de "Virología, Genética y Biología Molecular", los quiero mucho fueron grandes momentos a su lado e hicieron que todo fuera más fácil y divertido gracias por todo lo compartido.

Agradecimientos

A todos los que hicieron posible este trabajo: Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dra. Lucía Angélica García Camacho, Dr. German Isauro Garrido Fariña, MC Ernesto Marin Flamand.

Al jurado. Dra. Elizabeth Loza Rubio, Dr. José Francisco Morales Álvarez por su apoyo para culminar este trabajo.

Este proyecto fue apoyado y financiado por:

Proyecto CONACyT No. 221285, Genotipificación del gen *env* de retrovirus que impactan la salud de rumiantes domésticos.

Proyecto PIAPI1610, Uso de herramientas moleculares y bioinformáticas para la identificación de agentes infecciosos. Dentro del Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación.

Al programa de becas CONACyT, por su apoyo a estudiantes de posgrado.

Programa de Apoyo Económico a los Estudiantes de Posgrado UNAM

Contenido

1. Introducción	1
1.1 Leucosis Enzoótica Bovina	1
1.2 Inmunopatogénesis y cuadro clínico	2
1.3 Lesiones	4
1.4 Transmisión	5
1.5 Epidemiología	6
1.6 Diagnóstico	7
1.7 Prevención y control	9
1.8 Etiología	9
1.9 Estructura del virión	10
1.10 Genoma viral	11
1.11 Variabilidad genética	13
2. Justificación	14
3. Hipótesis	14
4. Objetivos	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos particulares	15
5. Material y métodos	16
5.1 Animales de estudio	16
5.2 Colección de muestras	16
5.3 Biometría hemática	16
5.4 Separación de leucocitos de sangre periférica (PBL)	17
5.5 Serología	17
5.6 Extracción de ADN	17
5.7 PCR	17
5.8 Secuenciación	19
5.9 Análisis de secuencias	19
5.10 Análisis bioinformático de las secuencias	19

5.11 Hibridación <i>in situ</i> (HIS).....	20
6. Resultados.....	22
7. Discusión.....	40
8. Conclusiones.....	47
9. Referencias.....	48
10. Anexos.....	56

Índice de figuras y cuadros

Figura 1. Curso clínico de la infección por VLB.....	3
Figura 2. A Linfosarcoma en corazón, múltiples lesiones neoplásicas en miocardio y aurículas. B) Linfocitos neoplásicos entre las fibras del miocardio con aumento de 400X.....	5
Figura 3. Mecanismos de transmisión de Leucosis Enzoótica Bovina.....	6
Figura 4. Estructura esquemática (a) del genoma del virus de Leucemia Bovina (VLB) y (b) la partícula Viral.....	10
Figura 5. Revisión de frotis sanguíneo teñido con Diff-Quick, observados con un aumento de 400x (A) y 1000x (B) para la determinación de linfocitosis.....	22
Figura 6. A, B y C. Amplificación por PCR de la región <i>pX</i> que incluye los genes <i>R3</i> , <i>G4</i> , <i>Rex</i> y <i>Tax</i> del VLB.....	24
Figura 7. Amplificación por PCR del gen <i>SDHA</i> en muestras con resultados negativos en PCRs que detectan ADN proviral del VLB.....	25
Figura 8. A) Cromatograma visualizado con el programa Chromas® de una muestra secuenciada por el método Sanger. B) Valor de similitud encontrado en una muestra secuenciada comparada con otras secuencias disponibles en el GenBank utilizando el programa Blastn.....	26
Figura 9. Árbol filogenético de 58 secuencias obtenidas de la región genética <i>pX</i> construidas con el algoritmo maximum likelihood utilizando un valor de 1000 bootstraps como soporte estadístico.....	27
Figura 10. Alineamiento con Web logo de secuencias nucleotídicas deducidas a aminoácidos de la región <i>pX</i> , de un total de 30 animales infectados con el VLB.....	28

Figura 11. Alineamiento con Web logo de secuencias nucleotídicas deducidas a aminoácidos de la región pX, de un total de 30 animales infectados con el VLB.....	29
Figura 12. Alineamiento con Web logo de secuencias nucleotídicas deducidas a aminoácidos de la región pX, de un total de 30 animales infectados con el VLB.....	30
Figura 13. Alineamiento con Web logo de secuencias nucleotídicas deducidas a aminoácidos de la región pX, de un total de 30 animales infectados con el VLB.....	33
Figura 14. A, B y C. Cambios histopatológicos en abomaso, se observan abundantes agregados de células mononucleares principalmente linfocitos neoplásicos en la mucosa del abomaso (flecha), submucosa de abomaso (flecha), morfología de linfocitos neoplásicos con marcada anisocitosis y anisocariosis (flecha). D y E. Linfocitos neoplásicos localizados entre las fibras del miocardio (flecha). F y G. Linfoblastos con nucléolos prominentes y mitosis (flecha).....	38
Figura 15. Marcaje de la sonda para la técnica de HIS con digoxigenina.....	38
Figura 16. Señal de hibridación (flecha) en células neoplásicas localizadas en linfonodo de un animal con linfosarcoma, utilizando como medio de contraste la tinción verde rápido 400X.....	39
Cuadro 1. Características de los iniciadores diseñados para la amplificación por PCR de la región genética pX del VLB.....	18
Cuadro 2. Concentraciones requeridas por reacción de PCR para la amplificación de la región pX del VLB.....	18
Cuadro 3. Bovinos evaluados por serología para la detección de anticuerpos contra el VLB obtenidos de diferentes Estado de la República Mexicana.....	22
Cuadro 4. Animales seropositivos al VLB de diferentes regiones con linfocitosis y sin linfocitosis.....	23
Cuadro 5. Resultados en bovinos de diferentes regiones donde se amplificó por PCR la región pX del VLB.....	25
Cuadro 6. Se muestran los porcentajes de similitud y la distancia genética, entre las secuencias obtenidas en este estudio por gen y por cuadro clínico o asintomáticas.....	34
Cuadro 7. Proporciones de mutaciones no sinónimas (dN) y mutaciones sinónimas (dS) de los diferentes genes que componen la región pX por grupo de animales con cuadros clínicos y asintomáticas.....	35
Cuadro 8. Muestras recolectadas para histopatología, de diferentes órganos, de nueve casos de vacas con cuadro clínico tumoral.....	36

Lista de Abreviaturas

LEB. Leucosis Enzoótica Bovina

VLB. Virus de Leucemia Bovina

LP. Linfocitosis persistente

OIE. Organización Mundial de Salud Animal

Pol. Polimerasa

Gag. Antígeno específico de grupo

Env. Envoltura

Gp 51. Glicoproteína 51

Gp 30. Glicoproteína 30

SU. Proteína de superficie

TM. Proteína de transmembrana

NC. Nucleocápside

MA. Proteína de matriz

CA. Cápside

IN. Integrasa

PR. Proteasa

ADN. Ácido desoxirribonucleico

LTR. Long Terminal Repeat

ARN. Ácido ribonucleico

Pb. Pares de bases

Pi. Postinfección

IDGA. Inmunodifusión en gel de agar

ELISA. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

HIS. Hibridación *in situ*

Fw. Iniciador sentido

Rv. Iniciador antisentido

SDHA. Succinato deshidrogenasa subunidad A

ng. Nanogramos

Resumen

La Leucosis Enzoótica Bovina es una enfermedad viral, producida por el Virus de Leucemia Bovina (VLB), que afecta al ganado bovino, en la mayoría de los casos no genera el desarrollo de signos clínicos (60%). Un 30% del ganado infectado desarrolla linfocitosis persistente (LP, expansión policlonal de linfocitos B) y entre un 5-10% de los bovinos infectados desarrollan linfosarcomas. El VLB pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Deltaretrovirus*. La región genética *pX* se ubica entre el gen *env* y la LTR del extremo 3' y contiene 4 genes con marcos de lectura superpuestos que codifican para las proteínas Tax, Rex, R3 y G4, involucradas en la regulación de la expresión viral a nivel transcripcional y post-transcripcional, además de tener un potencial oncogénico. El objetivo del presente trabajo fue identificar si la variabilidad en la región genética *pX* del VLB se asocia con las diferentes presentaciones clínicas o asintomáticas de la infección. A partir de un tamizaje serológico de 724 muestras de sangre de bovinos de la raza Holstein Friesian de diferentes edades, provenientes de seis Estados de la República Mexicana. Se separaron leucocitos de sangre periférica a partir de sangre completa con anticoagulante, de los leucocitos se extrajo el ADN genómico utilizando un kit comercial, mediante un análisis *in silico* se diseñaron iniciadores que hibridan en regiones conservadas de la región *pX* del VLB, lo que permitió la estandarización de las PCRs para la detección del ADN proviral en las células infectadas. Los amplicones positivos fueron secuenciados por el método Sanger. La población de estudio se conformó por 30 bovinos (12 con linfocitosis, 12 sin linfocitosis y 6 con tejidos tumorales), obteniendo el armado de 30 secuencias de 1156 nucleótidos que incluyen los cuatro genes de la región *pX*. En un análisis inicial se determinó que 23 de las secuencias se asociaron al genotipo 1 y 7 secuencias no se asociaron a ninguna secuencia de los genotipos de referencia incluidos. Los rangos de similitud entre las secuencias obtenidas fueron de un 92.8% a 100% y la distancia genética en un rango de 0 - 7.5%. Se identificaron dos secuencias con una delección de 3 nucleótidos (vaca con linfocitosis) y 9 nucleótidos (vaca sin linfocitosis) en el gen G4. En los tejidos tumorales de 9 bovinos se identificó mediante histopatología, hibridación *in situ* y PCR la presencia del VLB. El análisis de la región *pX* no permitió establecer una asociación entre la variabilidad de esta región con respecto, al desarrollo de linfocitosis, cuadro tumoral y el estado asintomático de los bovinos.

Palabras claves: VLB, Región *pX*, filogenia, secuencias.

Abstract

Enzootic Bovine Leukosis is a viral disease, caused by the Bovine Leukemia Virus (VLB), which affects cattle, in most cases does not generate the development of clinical signs (60%). 30% of infected cattle develops persistent lymphocytosis (LP, polyclonal expansion of B lymphocytes) and between 5-10% of infected cattle develop lymphosarcomas. The VLB belongs to the family Retroviridae and the genus Deltaretrovirus. The pX gene region is located between the ENV gene and the LTR of the 3' end and contains 4 genes with overlapping reading frames that code for the proteins Tax, Rex, R3 and G4, involved in the regulation of viral expression at the transcriptional level and post-transcriptional, in addition to having an oncogenic potential. The aim of the present work was to identify if the variability in the pX genetic region of the VLB is associated with the different clinical or asymptomatic presentations of the infection. From a serological screening of 724 blood samples of Holstein Friesian cattle of different ages, from six states of the Mexican Republic. Peripheral blood leukocytes were separated from whole blood with anticoagulant, leukocytes were extracted genomic DNA using a commercial kit, by means of an *in silico* analysis, primers were designed that hybridize in conserved regions of the pX region of the VLB, which allowed the standardization of PCRs for the detection of proviral DNA in infected cells. The positive amplicons were sequenced by the Sanger method. The study population consisted of 30 cattle (12 with lymphocytosis, 12 without lymphocytosis and 6 with tumor tissues), obtaining the assembly of 30 sequences of 1156 nucleotides that include the four genes of the pX region. In an initial analysis it was determined that 23 of the sequences were associated with genotype 1 and 7 sequences were not associated with any sequence of the included reference genotypes. The ranges of similarity between the obtained sequences were from 92.8% to 100% and the genetic distance in a range of 0 - 7.5%. Two sequences with a deletion of 3 nucleotides (cow with lymphocytosis) and 9 (cow without lymphocytosis) in the G4 gene were identified. In the tumor tissues of 9 bovines the presence of VLB was identified by histopathology, *in situ* hybridization and PCR. The analysis of the pX region did not allow to establish an association between the variability of this region with respect to the development of lymphocytosis, clinical tumor presentation and the asymptomatic state of cattle.

Key words: VLB, Region pX, phylogeny, sequences

1. Introducción

1.1 Leucosis Enzoótica Bovina

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) fue descrita por primera vez en Alemania por Leisering en 1871, quien detectó la presencia de nódulos amarillos en el bazo de una vaca, tres años más tarde, Bollinger describió la leucemia bovina como una enfermedad, y en 1876 Siedamgrotzky y Hofmeister registraron los primeros casos de neoplasias linfocíticas, el agente causal de esta enfermedad maligna fue aislado en cultivo en 1969 y designado como el virus de la leucemia bovina (VLB) (Bendixen, 1965). LEB es la patología neoplásica más común del ganado bovino, afecta principalmente al ganado lechero (Bai, *et al.*, 2015; Felmer y Zuniga, 2006). La enfermedad reduce la producción de leche, provoca decomiso de canales en el matadero por la presencia de linfosarcomas (Wu, *et al.*, 1989), disminuye la longevidad productiva de los animales, además de dificultar la exportación de estos (Miller, 1982).

El hospedero natural del virus de la leucemia bovina es el ganado doméstico y algunos estudios sugieren que los búfalos de agua también pueden infectarse naturalmente. La infección puede ser experimentalmente transmitida a varias especies, incluidos conejos, ratas, pollos, cerdos, cabras y ovejas. Las ovejas desarrollan en forma acelerada a leucemia y el linfoma en infecciones experimentales, y esta especie se ha utilizado como modelo de la enfermedad. No hay evidencia clara de que el virus de la leucemia bovina infecte humanos y extensos estudios epidemiológicos han fallado para mostrar cualquier conexión entre el consumo de leche y leucemia en personas que beben leche cruda de ganado infectado (Fenner, 2011).

El VLB se caracteriza por un periodo largo de latencia con ausencia de viremia, el periodo de latencia podría permitir al virus escapar del sistema inmune del hospedero y permitir el desarrollo tumoral (Pierard *et al.*, 2010).

La LEB es una enfermedad transmisible, prevalente en hatos de ganado bovino de muchos países. Solo una pequeña fracción de animales infectados desarrolla la forma clínica de linfosarcoma maligno, después de un largo período de incubación, sin embargo, la mayoría de los animales terminan su vida productiva sin mostrar signos clínicos (Tsutsui *et al.*, 2016).

1.2 Inmunopatogénesis y cuadro clínico

El VLB produce una infección crónica y persistente en linfocitos B (Kettmann *et al.*, 1980). La viremia es solo detectable las dos primeras semanas postinfección, a partir de entonces la expresión de antígenos virales difícilmente se evidencian, pero ocasionalmente se puede detectar en las zonas intrafoliculares y corteza de linfonodos mediante inmunocitoquímica (Haas *et al.*, 1992). El ganado desarrolla una respuesta serológica dirigida a la cápside y a las proteínas de envoltura entre la 2-8 semana postinoculación. Estos anticuerpos se mantienen de por vida y muestran variaciones importantes en sus niveles, probablemente relacionadas a el estado fisiológico y nutricional del animal. Anticuerpos contra proteínas reguladoras como Tax y Rex, también se pueden detectar en aproximadamente el 20% de los animales infectados (Powers *et al.*, 1991).

En la mayoría de los casos la enfermedad es asintomática (60%), sin signos clínicos aparentes, un 30% del ganado infectado desarrolla linfocitosis persistente (LP), que se caracteriza por una expansión policlonal de células B con el genoma viral integrado en un gran número de sitios del ADN, sin causar anomalías cromosómicas y entre un 5 -10% de los bovinos infectados predominantemente ganado adulto, mayor de 4-5 años, desarrollan tumores linfoides por células B principalmente en linfonodos, bazo, corazón, abomaso y menos frecuente en útero. A diferencia de los animales con LP, estos linfocitos son de origen mono u oligoclonal, en términos del sitio de integración viral, que es característico de cada tumor, el ADN proviral se integra en uno o varios sitios en el genoma de células neoplásicas en el ganado con linfosarcoma (Burny *et al.*, 1985).

El VLB puede infectar no solo a las células B, sino también a las células T CD8 +, monocitos, pero después de unas semanas, la respuesta inmune es eficiente y limita la infección de nuevas células (Suzuki *et al.*, 2013). La LP generalmente ocurre antes de los cinco años de edad (Mirsky *et al.*, 1996). Los linfocitos infectados proliferan y se expanden (expansión clonal o mitosis). La mayoría de los animales son portadores asintomáticos, en estos animales ni los signos clínicos ni el recuento de linfocitos se evidencian claramente. Después de una latencia de meses o años, los animales desarrollan una proliferación policlonal de células B, en la linfocitosis persistente (LP), esto significa que diferentes clonas de células B que portan el VLB integrado a su genoma proliferan. Esta condición clínica se caracteriza por un aumento en el número absoluto de linfocitos B circulantes en sangre periférica (por encima de 10.000 / mm³). Los

linfocitos B también se vuelven más abundantes que los linfocitos T, causando una inversión de la relación B / T. La LP en sí es una característica subclínica, sin embargo, los animales pueden presentar alteraciones del sistema inmune y ser más propensos a infecciones oportunistas (por ejemplo, mastitis). La LP suele ser estable durante varios años, pero también puede progresar a la fase tumoral. Debido a que la probabilidad de desarrollo tumoral es mayor en los animales que albergan niveles elevados de linfocitos circulantes, la LP en el ganado bovino se puede considerar como una etapa pretumoral (Gillet *et al.*, 2007) (figura 1).

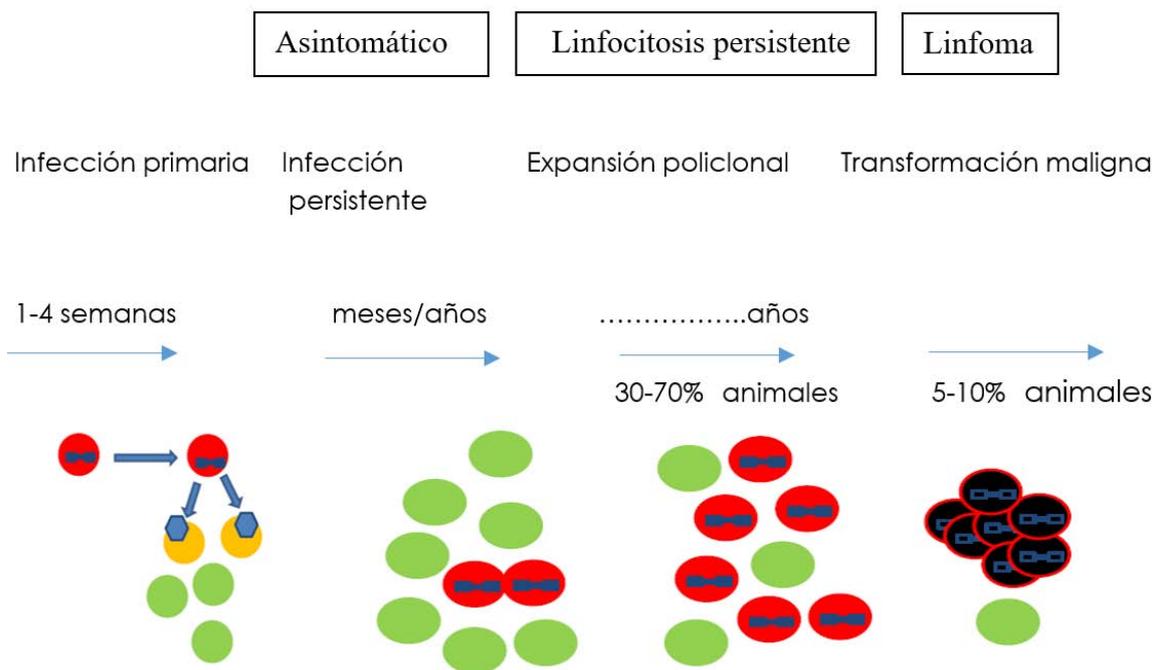


Figura 1. Curso clínico de la infección por el VLB. La infección primaria ocurre cuando una célula infectada con el provirus es transmitida a otro animal, durante la infección el provirus se expresa en partículas virales que infectan a los linfocitos B. Durante la infección persistente las células portadoras del provirus se expanden principalmente por mitosis, debido a la presencia de una respuesta inmune activa, esta fase se extiende por meses o años. Un porcentaje alto de animales presenta un aumento en la cantidad de células infectadas en la sangre (LP). En la fase tumoral una sola célula infectada sufre mutaciones genéticas y forma un linfoma dentro o fuera de los linfonodos. Adaptado de Gutiérrez *et al.*, 2014b.

La manifestación clínica más notoria de la infección por el VLB es el desarrollo de tumores. A diferencia de la LP, la expansión de las células infectadas es de origen mono u oligoclonal, lo que significa que solo una

o algunas células infectadas generarán el tumor después de múltiples divisiones (Gutiérrez *et al.*, 2014b).

El retrovirus de la LEB es un virus de transformación lenta, que no posee oncogenes. El mecanismo por el que provocan transformaciones neoplásicas se ha denominado mutagénesis de inserción. En algunas células el ADN proviral se integra cerca de un protooncogén, la expresión de éste puede estar incrementada por la presencia de fuertes promotores y elementos reguladores que interaccionan con las LTRs virales y da lugar a una mayor transcripción del oncogén, estos fenómenos tienen periodos de latencia largos (Cadavid, 2012).

1.3 Lesiones

El VLB se caracteriza por producir linfosarcomas multicéntricos en bovinos adultos, tumores constituidos por linfocitos neoplásicos que se desarrollan rápidamente en varios lugares del cuerpo y por tanto con signología variable. Los órganos afectados con mayor frecuencia son el abomaso, corazón, bazo, intestino, hígado, riñón, útero, meninges, tejido linfático retrobulbar y cerebro. Los signos clínicos de la LEB son inespecíficos y depende del órgano afectado (Cadavid, 2012).

Algunos signos clínicos son anorexia, depresión, el agrandamiento de los linfonodos, taquicardia, pulso yugular positivo, timpanismo ruminal con reflujo abomasal, indigestión, diarrea, exoftalmos, mucosas pálidas, heces oscuras y malolientes, tumoraciones en útero, disminución paulatina de la producción de leche hasta el cese total, disminución progresiva de la condición corporal, incluso la muerte del animal. El signo más frecuente que lleva a pensar en la enfermedad es el agrandamiento bilateral y más o menos simétrico de los linfonodos explorables. La exoftalmia por tumores en el tejido retro ocular y/o de las estructuras internas del ojo, son comúnmente signos de la enfermedad (Cadavid, 2012).

El útero presenta paredes engrosadas por la infiltración de tejido de color blanco-gris mate. El abomaso aparece infiltrado por el tejido tumoral produciéndose aumento del grosor de la pared, aunque también puede presentar úlceras. En el intestino se pueden presentar lesiones semejantes a las del abomaso, pero la tendencia a la presentación de úlceras es mayor en la mucosa intestinal (Chamizo, 2005).

En el corazón, las masas tumorales invaden particularmente el atrio derecho, aunque se pueden encontrar por todo el miocardio y se extienden al pericardio. La afectación de la pared del ventrículo derecho causa insuficiencia cardiaca congestiva (Kahn, 2007).

El aspecto microscópico de estas neoplasias se caracteriza por la presencia de linfocitos con características neoplásicas; son células grandes con un núcleo redondeado, indiferenciado y grandes nucléolos, cromatina laxa y citoplasma abundante. Las mitosis son comunes y numerosas. La presencia de anomalías en el cariotipo como: aneuploidias con cromosomas adicionales, son pruebas claras del carácter neoplásico de estas células. Las anomalías pueden variar de un animal a otro, pero se mantienen constantes en el mismo animal, lo cual demuestra que el tumor es monoclonal (Chamizo, 2005) (figura 2).

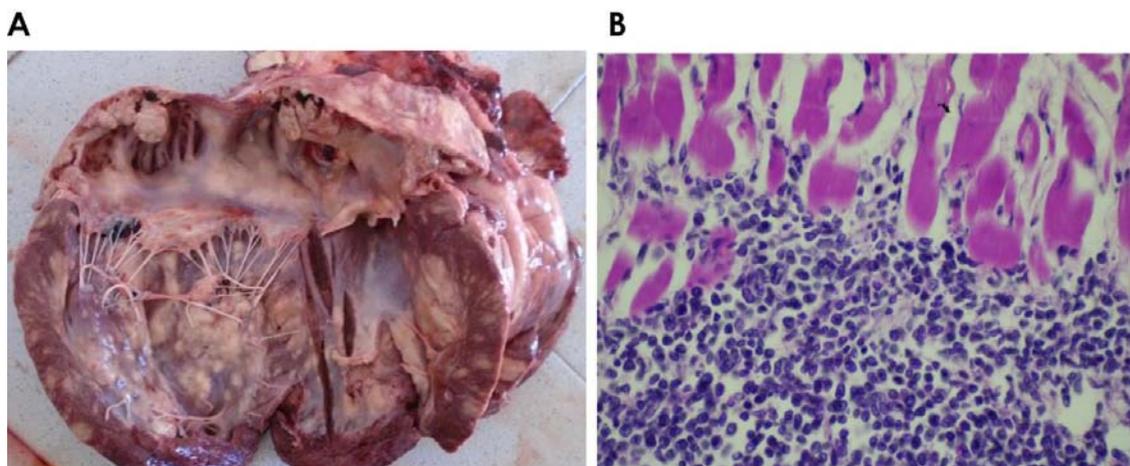


Figura 2. A Linfosarcoma en corazón, múltiples lesiones neoplásicas en miocardio y aurículas. B) Linfocitos neoplásicos entre las fibras del miocardio con aumento de 400X (Ramón, 2018).

1.4 Transmisión

El VLB se transmite tanto vertical como horizontalmente dentro de las poblaciones de ganado. La transmisión vertical ocurre cuando las madres infectadas transmiten la infección a través de la placenta, el parto, el calostro y la leche a su descendencia (Tsutsui *et al.*, 2016). Aunque la transmisión en el útero del VLB de una vaca a su feto puede ocurrir, es relativamente en una tasa baja 4 - 18%. La transmisión por medio del calostro y la leche es la ruta más relevante de infección del recién nacido. La inseminación artificial también ha sido reportada (Ferrer y Kenyon, 1981).

Existen varias rutas para la transmisión horizontal del VLB, incluida la palpación rectal sin cambio de guantes, el uso de una sola aguja para múltiples animales, transferencia iatrogénica a través del uso de instrumentos veterinarios contaminados cuando se realizan prácticas de manejo como descornado, tatuaje de oreja, los cuales están bien documentados como fuentes de transmisión del VLB entre animales infectados y no infectados (Meas *et al.*, 2002), presencia de insectos que se alimentan de sangre y contacto cercano entre animales (Gutiérrez *et al.*, 2014a) (figura 3).

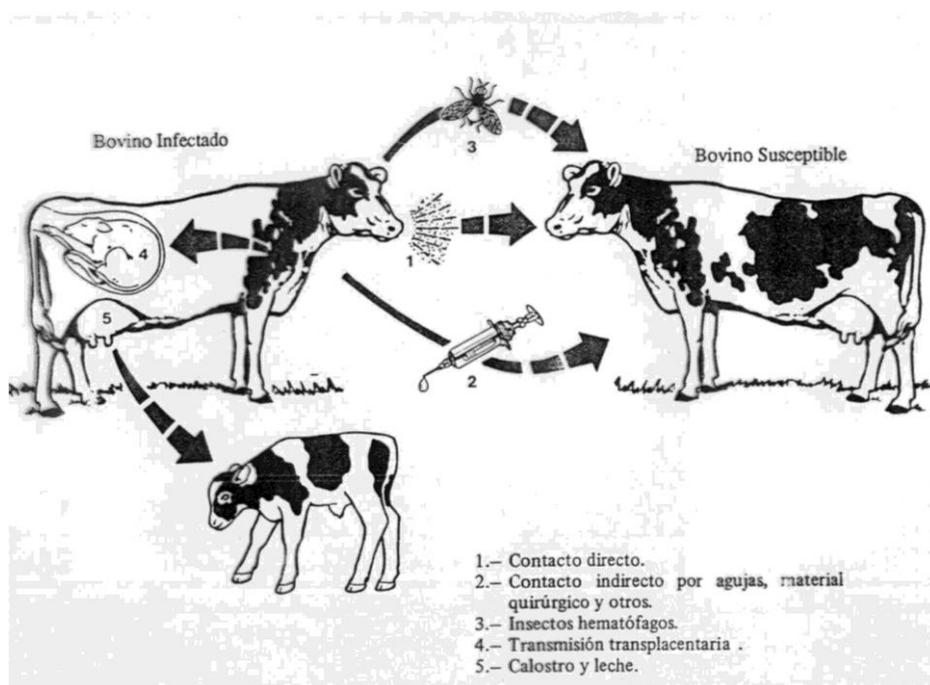


Figura 3. Mecanismos de transmisión de la Leucosis Enzoótica Bovina (Castelli 1999).

1.5 Epidemiología

La LEB está muy extendida en todos los continentes, aunque los planes de erradicación se aplicaron con éxito en los países de Europa Occidental y Oceanía, por el contrario, se reportan altas tasas de prevalencia en América del Norte, América del Sur y Asia (Rodríguez *et al.*, 2011).

La LEB está incluida en la lista de enfermedades de notificación obligatoria para la Organización Mundial de Salud Animal (OIE); Mientras que para México la enfermedad está clasificada en el grupo 3 del acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos, en este grupo se encuentran las enfermedades

enzoóticas que presentan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y del comercio nacional e internacional. Es de notificación mensual obligatoria a las autoridades competentes de sanidad animal del país (D.O.F).

En México, el diagnóstico de LEB desafortunadamente no se realiza rutinariamente, por lo que la introducción del ganado infectado proveniente de Norte América durante los últimos años, ha generado un incremento en la presentación de casos clínicos (Hernández *et al.*, 2006). En los hatos ganaderos del país, independientemente del fin zootécnico, no se tiene conocimiento de la prevalencia de la infección y las pérdidas asociadas a ella. En un estudio preliminar realizado en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, CAIT, el 29% de las vacas presentaban linfocitosis persistente, mientras que el 55% fueron positivas a la prueba de ELISA (Hernández *et al.*, 2006).

Los primeros reportes de la enfermedad en México datan de 1967 (Uruchurtu, 1967). De 1969 a 1982, la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Salud Animal (SARH) reportó 220 casos clínicos en la República Mexicana (Monroy, 1987). En 1979, Vilchis demostró que animales de raza Holstein importados y localizados en Tulancingo, Hidalgo, presentaron un 22.5% de seropositividad respecto al ganado Nacional de 12.5%. En 1983, Suzan *et al.*, encontraron una tasa del 36.1% (541/1498) de seropositividad en nueve Estados de la República utilizando la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Monroy en 1987, reportó variaciones entre el 8% y 58% de seropositividad en los Estados de Puebla, Veracruz, Oaxaca, Yucatán y Tamaulipas, mediante la técnica de IDGA (Monroy, 1987). En 1995, Avalos reportó un 42% (423/1007) de seropositividad en el Estado de Nuevo León mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Osuna en 2003, en el Estado de Sonora, encontró 16% (74/460) mediante la prueba de ELISA. Zavaleta (2009), reportó 66% de seroprevalencia en CAIT mediante la prueba de ELISA y para el año de 2017 Cancino, encontró un 58.7% (118/201) de seropositividad en los Estados de Jalisco, México e Hidalgo utilizando una prueba de ELISA.

1.6 Diagnóstico

Un primer acercamiento al diagnóstico puede realizarse a través de la signología clínica en bovinos con linfosarcoma y posterior estudio histopatológico en biopsias de los tumores. La LP se diagnostica mediante

exámenes hematológicos periódicos, que demuestran la persistencia de la linfocitosis por al menos 3 meses (Cadavid, 2012).

En los estudios de infección con el VLB se han empleado numerosos métodos diagnósticos tales como: seroneutralización (SN), radioinmunoensayo (RIA), IDGA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), *western blot* (WB) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Martin *et al.*, 2001).

En varios países existen programas oficiales para el control y erradicación de la LEB. El diagnóstico se realiza rutinariamente por métodos serológicos. La IDGA ha sido por muchos años la prueba de elección por su alta especificidad y aceptable sensibilidad, y se han desarrollado distintos estuches comerciales de ELISA para ser utilizados en muestras de suero y/o leche (González *et al.*, 2001).

La detección serológica mediante IDGA o ELISA, de anticuerpos principalmente contra la glicoproteína gp51 de la envoltura viral, constituyen el método más usado para detectar animales infectados (Jimba *et al.*, 2012), estas pruebas son oficiales y reconocidas por la OIE.

La PCR es una prueba conveniente para detectar ADN proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo un método sensible que permite un diagnóstico rápido y temprano (González *et al.*, 2001). Esta prueba también es aceptada actualmente por la OIE para el diagnóstico del VLB, aunque en forma alternativa como prueba confirmatoria de las pruebas serológicas. Diversos autores han demostrado una menor sensibilidad de la IDGA respecto a las pruebas diagnósticas de ELISA y PCR (Trono *et al.*, 2001).

El diagnóstico de LEB requiere la demostración de células malignas en los linfonodos superficiales agrandados o la presencia de linfocitos neoplásicos en la sangre periférica con linfocitosis. La punción con aguja fina (PAF) de los nódulos linfáticos se realiza para diagnosticar LEB, pero su sensibilidad y especificidad de la PAF no es confiable, con 38 a 67% y 25 a 80%, respectivamente. A menudo es difícil diagnosticar la aparición de LEB en casos que no presentan linfocitosis o linfonodos agrandados. Recientemente, se ha informado sobre marcadores para diagnosticar el inicio de LEB, la actividad de la timidina quinasa (TK) sérica, es un potencial biomarcador para el diagnóstico clínico de LEB, pero requiere una prueba de radioinmunoanálisis que no se realiza en muchos laboratorios. La expresión de ciertos genes, como el receptor de interleucina 2 y los genes del tumor de Wilms en sangre periférica, también pueden ser candidatos a marcadores clínicos para malignidad,

sin embargo, presentan baja sensibilidad y especificidad (Miura *et al.*, 2015).

1.7 Prevención y control

Tradicionalmente, las prácticas de manejo recomendadas para el control de la transmisión han incluido el uso único de agujas hipodérmicas para cada vaca, control de moscas y otros insectos picadores, segregación del ganado positivo o con linfocitosis, alimentar a los terneros únicamente con calostro y leche tratados térmicamente o con sustitutos, limpieza y desinfección de equipo contaminado con sangre infectada utilizado en la aplicación de aretes, tatuajes o descornes, minimizar el contacto de los terneros con ganado positivo al VLB, monitorear la prevalencia del VLB con pruebas serológicas en suero o leche, mantener un hato cerrado o solo agregar ganado vacuno seronegativo al VLB que se vuelve a evaluar negativo, después de un periodo de cuarentena probar y eliminar el ganado VLB-positivo. Las rutas de transmisión en cada hato son variables, por lo que cada granja podría requerir un programa personalizado y se debe monitorear rutinariamente su prevalencia para determinar la efectividad del mismo (Norby *et al.*, 2014).

La decisión de implementar un programa de control del VLB en un hato requiere una evaluación de los costos causados por la enfermedad contra los costos para controlarla. Tradicionalmente, los únicos costos reconocidos por la infección por el VLB, son los asociados con la pérdida de los animales que presentan linfosarcoma; sin embargo, sobre la base de resultados recientes, ahora es evidente que los costos asociados con la pérdida de producción láctea y la disminución de la longevidad de las vacas, también necesitan ser considerados. Además, en la medida que más países intentan la erradicación del VLB, el mercado de exportación de animales puede disminuir (Norby *et al.*, 2014).

1.8 Etiología

Virus de Leucemia Bovina

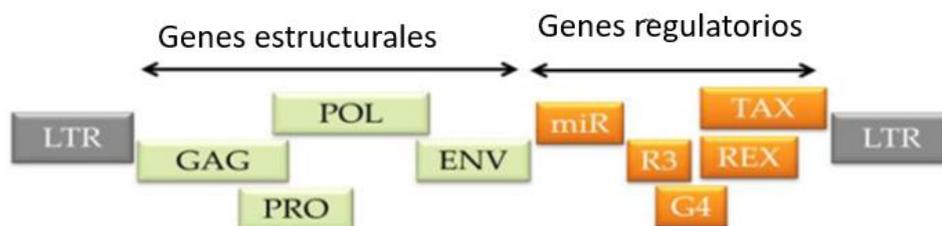
El VLB es miembro de la familia *Retroviridae*, pertenece al género *Deltaretrovirus*. Este género también incluye al virus linfotrópico de células T humano (HTLV) y el virus linfotrópico de células T del simio (STLV)(Burny *et al.*, 1988). El VLB ha servido de modelo para el estudio del HTLV (El Hajj *et al.*, 2012). Estos virus exhiben linfotropismo y son capaces de regular la

expresión de sus genes, con proteínas expresadas por su propio genoma, en particular, la proteína viral reguladora denominada Tax, que puede inducir la transcripción tanto de genes virales como celulares (Rama, 2009).

1.9 Estructura del virión

El diámetro de la partícula viral varía de 60 a 125 nm, son viriones envueltos de forma icosaédrica. El virión presenta dos subunidades del genoma de ARN de una sola cadena, de polaridad positiva, de aproximadamente 8700 nucleótidos (Sagata *et al.*, 1984) estabilizados mediante interacción con la nucleoproteína p12 de la nucleocápside. Este complejo a su vez está rodeado por una estructura llamada cápside, formada por el autoensamblado de la proteína p24. Rodeando a la cápside se encuentra una malla de proteínas de matriz, las cuales entran en contacto directo con una membrana celular formada por una bicapa lipídica, la cual incluye a la glicoproteína de envoltura Env, la cual se corta por proteólisis en gp30 transmembrana (TM) y en la glicoproteína de superficie gp51 (SU). El genoma viral codifica para las enzimas transcriptasa reversa, proteasa e integrasa (Gillet *et al.*, 2007) (figura 4).

a)



b)

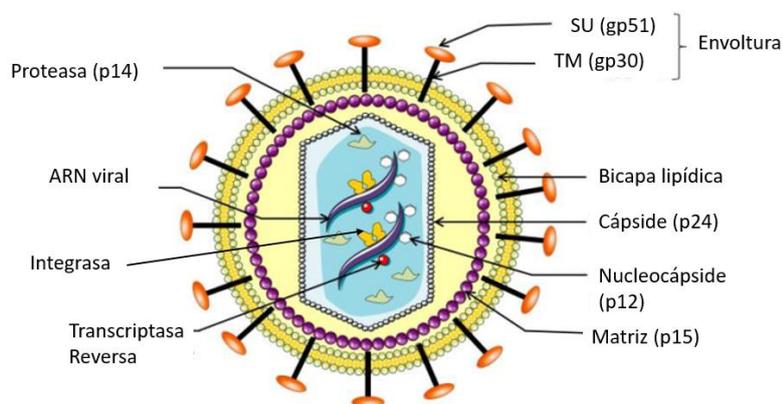


Figura 4. Estructura esquemática (a) del genoma del virus de leucemia bovina (VLB) y (b) proteínas de la partícula viral. Adaptado de Barez *et al.*, 2015.

1.10 Genoma viral

Todos los retrovirus están constituidos por genes esenciales, *gag*, *pro*, *pol* y *env*, que son necesarios para la producción de virus infecciosos, y están flanqueados por dos secuencias repetidas terminales largas idénticas LTRs (Polat *et al.*, 2017).

El gen *gag* del VLB se traduce como el precursor Pr45 Gag y al incidirse se generan tres proteínas: la proteína de la matriz (p15) que se une al ARN genómico viral e interactúa con la bicapa lipídica de la membrana viral; la proteína de la cápside (p24) que determina los títulos de anticuerpos en el suero de los animales infectados (Willems *et al.*, 1997) y la proteína de nucleocápside (p12) que se une al ARN (Kato *et al.*, 1993). El gen *prot* codifica de forma independiente para la proteasa viral (p14); el gen *pol* expresa la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN). El gen *env* codifica las glicoproteína de la envoltura del virión (gp51) y una proteína de transmembrana (gp30) (Polat *et al.*, 2017; Gillet *et al.*, 2007).

Las glicoproteínas de la envoltura de los retrovirus juegan un papel crucial en el ciclo de replicación del virión, son responsables del tropismo celular, ya que contienen el sitio de reconocimiento del receptor de superficie celular requerido para la entrada de virus. Su localización en la superficie de la partícula viral explica por qué son blanco natural para anticuerpos neutralizantes. En el caso del VLB estas proteínas también están implicadas en la inducción de la fusión celular (Mamoun *et al.*, 1990).

A diferencia de retrovirus simples, el genoma de los deltaretrovirus llevan genes adicionales con marcos de lectura superpuestos que codifican para varias proteínas reguladoras y accesorias de la región *pX* (Tax, Rex, R3 y G4) (Sagata *et al.*, 1984). La codificación en el marco de lectura abierto de la proteína reguladora Tax, es el más grande en la región *pX*, ubicada entre el gen *env* y LTR 3', el inicio de la traducción del gen *tax* se produce en un codón AUG ubicado justo antes del codón de paro para el gen *pol* (Nagashima *et al.*, 1986). El gen *tax* codifica una proteína que tiene un peso de 34 KDa (p34) localizada en el núcleo de la célula (Lagarias & Radke, 1989), p34 juega un papel importante en la transcripción viral uniéndose a secuencias presentes en la LTR 5'. Estas secuencias tienen tres repeticiones de 21pb en la LTR U3-5', llamados TxREs (elementos de respuesta a *tax*) (Derse, 1987), p34 no se une directamente a estos TxREs (Yoshida M., 2001), indirectamente al unirse a una proteína llamada b-ZIP (zipper básico) -P34t / b-ZIP-, forman un complejo proteico que actúa a través de factores celulares como la unión a elementos de respuesta de AMPc (CREB) y activación del factor de transcripción ATF (Adam *et al.*, 1994). CREB es una proteína que actúa como un factor de transcripción, por lo tanto, se une a ciertas secuencias (TGACGTCT) llamadas elemento de respuesta a AMPc (CREM) encontrados en TxREs

que aumenta o disminuye la transcripción corriente abajo regulada por estos genes. Este complejo proteico también puede reclutar coactivadores como CBP / p300 (una proteína de unión coactivadora) que facilita la iniciación de la transcripción de la célula para remodelar la cromatina. Además de su papel del gen *tax* como un activador transcripcional, modula la expresión de varios genes celulares (Nagashima *et al.*, 1986; Willems *et al.*, 1987). La proteína Tax también coopera con el oncogén Ha-ras para inducir la transformación de fibroblastos de embriones de rata (REF) que forman tumores en ratones desnudos (Pozzatti *et al.*, 1990; Willems *et al.*, 1990).

El gen *Rex* es un regulador postranscripcional de la replicación viral, mediante la estabilización del ARN viral para facilitar la traducción (Powers *et al.*, 1991). Es una fosfoproteína nuclear que actúa después de la transcripción a través de elementos de acción cis en LTR, para regular los niveles de expresión de genes que codifican los componentes del virión. El análisis de secuencia de varios aislados virales ha demostrado que el gen *Rex* es conservado, con una variación de menos del 5% (Choi y Hope, 2005). El gen *G4* se expresa principalmente en la fase de leucemia *in vivo* (Alexandersen *et al.*, 1993) y cuando se expresa en células primarias induce su inmortalización (Kerkhofs *et al.*, 1998). Aunque las funciones de los genes *R3* y *G4* no se han establecido claramente, su significado biológico ha sido demostrado. De hecho, los provirus mutantes sin los genes *R3* y *G4* retienen su infectividad (Adam *et al.*, 1994). Por lo tanto, *R3* y *G4* son prescindibles para la infectividad "*in vivo*", pero la integridad de estos genes es esencial para permitir la propagación eficiente del virus en el hospedero (Kettmann *et al.*, 1980).

La proteína *Rex* es importante para la regulación de la transcripción viral y la exportación nuclear de ARN viral, promueve la acumulación citoplasmática y la traducción de RNAm. Las proteínas Tax y Rex se consideran esenciales ya que su mutación anula la infectividad viral y patogenicidad (Ross *et al.*, 1996; Willems *et al.*, 1990). Las proteínas *R3* y *G4* contribuyen a mantener la carga viral y *G4* exhibe potencial oncogénico, dicho potencial ha sido demostrado cuando interactúa con la sintetasa de pirofosfato de farnesilo (FPPS), e induce la transformación celular (Lefebvre *et al.*, 2002).

Las regiones LTR juegan un papel crucial en el ciclo vital del retrovirus. Son responsables de la expresión génica viral y son necesarias para la integración viral en el genoma celular. La LTR se divide en tres regiones: U3, R y U5. A U3 se unen una serie de cooperadores ("enhancers") que ayudan a regular los niveles de expresión génica del provirus. Esta dependencia de los cooperadores de origen celular hace que muchos retrovirus sean especie específicos. Entre la región 5' de la LTR y el codón de inicio del gen *gag* hay una secuencia líder y en ella se encuentran tres locus muy importantes, el sitio de unión del cebador (PBS), donde tiene

lugar la unión de un ARNt que sirve de cebador para la transcriptasa inversa. Un segundo locus se encuentra relacionado con los transcritos del gen *env* y el último locus es de secuencias de empaquetamiento que permiten al ARN viral ser reconocido por las proteínas Gag para ser incorporado al virión y ser expulsado de la célula (Cadavid, 2012).

Sus principales elementos reguladores son tres copias de una secuencia potenciadora, no estrictamente conservada, de 21pb denominadas elementos de respuesta a *tax* (TRE). Los TRE son esenciales para la respuesta del promotor a la proteína viral transactivadora Tax (Zhao *et al.*, 2007a).

1.11 Variabilidad genética

La mutación y la recombinación son los mecanismos que utilizan los virus ARN para generar variabilidad genética. La mutación sucede por la ineficiente capacidad de la ARN polimerasa para la corrección de errores, lo que determina una frecuencia de error del orden de 10^4 sustituciones por nucleótido y ciclo replicativo, con generación de un gran número de variantes virales en el curso de una infección. La presencia de diferentes poblaciones virales en un mismo hospedero, sean variantes que conforman al espectro de cuasiespecies o cepas de diferentes genotipos que coinfectan a una misma célula, abre la puerta a otro mecanismo de diversidad genética denominado recombinación. Esta consiste en la generación de nuevas estirpes a través de diferentes combinaciones genéticas entre variantes distintas (Moratori, 2012).

Los primeros estudios sobre la variabilidad genética del VLB mostraban muy poca variación entre las diferentes estirpes analizadas (Coulston *et al.*, 1990). La clasificación filogenética actual supone la existencia de 10 genotipos que se correlacionan de acuerdo al origen geográfico de los aislamientos, lo que sugiere que el VLB tiene mayor diversidad de lo que se había previsto (Polat *et al.*, 2017).

2. Justificación

Los bovinos infectados por el VLB pueden desarrollar diferentes patologías relacionadas con cuadros clínicos tumorales y linfocitosis persistentes, más del 60% de los bovinos infectados no desarrollan cuadros aparentes de enfermedad, lo que podría relacionarse con resistencia genética de algunas razas o con el tipo genético del virus que los infecta o ambos. Estudiar la variación genética de la región *pX* del virus, la cual se ha relacionado con el desarrollo tumoral, podría ayudar a esclarecer la relevancia de esta región con el desarrollo de cuadros tumorales y de linfocitosis.

3. Hipótesis

Si la genética del virus de leucemia bovina define el desarrollo de diferentes estados de infección en bovinos lecheros infectados, entonces, es posible identificar diferentes patrones de secuencias nucleotídicas en la región *pX* del VLB en bovinos con linfocitosis, lesiones tumorales o ausencia de enfermedad.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar si la variabilidad en la región genética pX del VLB se asocia con las diferentes presentaciones clínicas o asintomáticas de la enfermedad.

4.2 Objetivos particulares

1. Identificar hatos bovinos en diferentes Estados de la República Mexicana, infectados por el VLB utilizando pruebas de ELISA comerciales.
2. Clasificar presencia de lesiones tumorales, linfocitosis y asintomáticos.
3. Realizar estudios histopatológicos en el caso de animales con lesiones tumorales e identificar la presencia del virus en estos tejidos por hibridación *in situ*.
4. Amplificar por PCR la región genética pX del VLB.
5. Secuenciar los amplicones.
6. Analizar las secuencias nucleotídicas con programas bioinformáticos para determinar la variabilidad genética del virus, filogenia y los patrones de secuencias.

5. Material y métodos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular (L-504) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; ubicado en la carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

5.1 Animales de estudio

El estudio se realizó con diferentes hatos de producción lechera intensiva, ubicados en los Estados de Hidalgo, Aguascalientes, Tlaxcala, Puebla, Guanajuato y Coahuila, seleccionando vacas de la raza Holstein Friesian, en producción de diferentes edades. El muestreo se realizó por conveniencia con productores cooperantes, en el cual se participó de manera activa en la mayoría de los muestreos en los estados mencionados.

5.2 Colección de muestras

Se tomaron muestras de sangre por punción de la vena coccígea utilizando tubos con vacío y anticoagulante (heparina) (Vacutainer®, USA), con agujas estériles calibre 20, parte de la muestra se utilizó para realizar pruebas de biometría hemática y determinar la presencia de linfocitosis.

Si los animales con lesiones clínicas sugestivas fueron destinados al sacrificio, se colectaron muestras de las lesiones tumorales que se fijaron en formalina amortiguada al 10% para posteriormente incluirlas en parafina y realizar cortes de 3 μm , que se tiñeron con una coloración de rutina de hematoxilina y eosina (HE). Los cortes se evaluaron y se caracterizaron las lesiones observadas considerando: presencia de células neoplásicas, pleomorfismo celular, anisocitosis, anisocariosis y mitosis por campo.

5.3 Biometría hemática

Se realizó el conteo leucocitario de forma manual en cámara de Neubauer (Voigt, 2000; Nuñez y Bouda, 2007). La sangre se colocó en una pipeta de Thoma hasta la marca de 0.5 μl y el resto se diluyó con el reactivo de Turk (base ácido acético glacial al 2% y azul de metileno) hasta la marca de 11 μl . Posteriormente, la mezcla se agitó durante un minuto y se descartaron las primeras tres gotas para llenar el hemocitómetro. El conteo se realizó en el microscopio óptico con el objetivo de 100x. El conteo leucocitario diferencial se hizo en extendidos

de sangre teñidos con Diff-Quick (Hycel®, México). Pasándolos por solución fijadora 10 segundos (solución alcohólica), hemocolorante 1 (solución de eosina amarillenta en amortiguador de fosfatos) 10 segundos, hemocolorante 2 (solución de azur-eosina azul de metileno en amortiguador de fosfatos) 10 segundos, lavado con agua, se dejaron secar al aire y se observó con el objetivo de 400X. Los animales con cuentas mayores de 10,000 linfocitos/mm³ fueron considerados con linfocitosis (Gutiérrez *et al.*, 2014b).

5.4 Separación de leucocitos de sangre periférica (PBL)

La separación de leucocitos y plasma se realizó de acuerdo al protocolo de (Gorodezky *et al.*, 2009) (anexo 1).

5.5 Serología

El plasma se utilizó para la identificación de anticuerpos contra el antígeno gp51 del VLB (ELISAI, VMRD Inc. Pullman, WA. USA). La técnica se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante, para establecer el estado seropositivo o seronegativo de los animales (anexo 2).

5.6 Extracción de ADN

Los PBL y los tejidos tumorales ya incluidos en parafina, fueron procesados para extraer ácidos nucleicos (ADN genómico) utilizando un kit comercial FavorPrep™ TissueGenomic DNA Extracción Mini Kit (Favorgen, Taiwan), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 3). El ADN se cuantificó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop Lite™, Thermo Scientific™ USA) y se almacenó a -75°C hasta ser utilizado.

5.7 PCR

Para el diseño de los iniciadores que se utilizaron en la PCR, se empleó el software BioEdit y Primer 3 input V4.0. Se compararon las secuencias de diferentes genotipos del VLB de distintos países disponibles en el GenBank, utilizando como blanco la región *pX*, los iniciadores fueron enviados para su síntesis (IDT®, USA) (cuadro 1). La mezcla de reacción de la PCR fue: buffer 1X (Biotecmol, México), 2mM de MgCl₂ (kapa Biosystems, USA), 230 μM de cada dNTPs (Kapa Biosystems, USA), 400 nM de cada iniciador (IDT), 2.5 U/μl de Taq ADN polimerasa (kapa Biosystems, USA) y de 0.5 μg de ADN por reacción en un volumen final de 30 μl (cuadro 2). Las condiciones de amplificación de las PCRs fueron: desnaturalización inicial

por 5 min a 95° C seguido por 40 ciclos a 95° C por 40 s, alineamiento a 54° C para la primer PCR, 56° para la segunda PCR y 47° para la tercer PCR por 40 s y extensión a 72° C por 50 s y un paso final de extensión a 72° C por 15 minutos. Al finalizar la PCR, los productos fueron analizados y separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, conteniendo bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador con luz UV (UVP, M-20E, USA). Los productos procedentes de bandas que se identificaron en el tamaño esperado, fueron cortados y purificados con un kit comercial (Favorgen®, Tailandia) (anexo 4).

Cuadro 1. Características de los iniciadores diseñados para la amplificación por PCR de la región genética *pX* del VLB.

Iniciador	Secuencia	Longitud	T _m	%GC	Tamaño producto
Fw1px	TCAGTGTACCATCACAAGC	19	52.60°C	47.37	838pb
Rv1px	ACCAACAACACTTGCTTAAA	20	53.49°C	35.00	
Fw2px	AACAGTGCCCATAAAGTCC	19	55.05°C	47.37	899pb
Rv2px	CGGTTAGGAATAGGTCGAT	19	54.25°C	47.37	
Fw3px	ATGGCCAATTTTCCTTACT	20	55.41°C	35.00	537pb
Rv3px	ACGTCTCTGTCTGGTTACG	20	55.40°C	50.00	

T_m sugerida por el fabricante (IDT®)

Cuadro 2. Concentraciones requeridas por reacción de PCR para la amplificación de la región *pX* del VLB*.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10X	1X
Deoxinucleotidos trifostatos	10mM	230µM
MgCl ₂	25mM	2 mM
Iniciador Fw 1px,2px,3px	10µm	400nM
Iniciador Rv 1px,2px,3px	10µm	400nM
Taq ADN polimerasa	5U/µl	2.5 U/ µl /reacción
ADN molde		500ng

*Para un volumen final de 30µl.

Se utilizó una PCR que amplifica el gen constitutivo SDHA (Succinato deshidrogenasa subunidad A) (PCR-SDHA), para comprobar la integridad estructural del ADN de aquellas muestras negativas al VLB. El producto esperado fue de 384 pb. Las secuencias de los iniciadores fueron: Fw-CATGGAGGAGGACAACCTG y Rv-TGGTAGATCTTCCCCTCTC. La mezcla de reacción de la PCR fue: buffer 1X (Biotecmol, México), 2mM de MgCl₂ (Amplificasa® Biotecmol, México), 280 μM de cada dNTPs (Kapa, USA), 600 nM de cada iniciador (IDT), 5 U/μl de Taq ADN polimerasa (Amplificasa® Biotecmol, México), y 100 ng/μl de ADN por reacción en un volumen final de 15 μl. Las condiciones de amplificación de la PCR fueron: desnaturalización inicial por 5 min a 95° C seguido por 30 ciclos a 95° C por 30 s, alineamiento a 53° C 30s y extensión a 72° C por 30 s y un paso final de extensión a 72° C por 15 minutos. Al finalizar la PCR el producto fue analizado y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, conteniendo bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador con luz UV (UVP, M-20E, USA).

5.8 Secuenciación

El ADN purificado fue secuenciado por el método Sanger en un secuenciador modelo 3130xl Genetic Analyzer de 16 capilares en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES-Iztacala UNAM. La amplificación de ADN se llevó a cabo por medio de estuches que contienen enzimas de alta fidelidad, procesividad y especificidad, requeridas en secuenciación y clonación molecular (BygDye V3.1). Los productos de amplificación por PCR fueron secuenciados para ambas cadenas utilizando los iniciadores utilizados en la PCR.

5.9 Análisis de secuencias

Se alinearon las secuencias de aminoácidos mediante Web logo con el programa de Geneious v11.0.3. Los puntos denotan conservación de aminoácidos en una misma posición, con la altura de cada letra se indica la proporción de secuencias que contiene el residuo de ese sitio, generando el programa una secuencia consenso.

5.10 Análisis bioinformático de las secuencias

Filogenia

Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas con el programa Chromas 2.23 (Technelysium, Helensvale, Australia) y editadas con el programa BioEdit®. Se realizaron alineaciones múltiples para los estudios de comparación y filogenéticos con el programa ClustalX y MEGA® v7.018. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el algoritmo Maximum Likelihood, con la distancia de Tamura-Nei Gamma, utilizando

el programa MEGA® v7.018. Los límites de confianza estadística de la topología de los filogramas se determinaron con ayuda de 1000 bootstraps.

Mutaciones sinónimas y no sinónimas

Se determinó la proporción de mutaciones sinónimas (dS) y no sinónimas (dN) de las secuencias obtenidas utilizando el programa SNAP v2.11 (Korber, 2000), disponible en www.hiv.lanl.gov. La proporción de dN/dS es una de las medidas más confiables para identificar presiones virales evolutivas en regiones codificantes, la interpretación es simple e intuitiva, si la proporción de dN/dS es <1 se considera como una selección negativa y siendo positiva cuando es >1.

Distancia genética y similitud

El cálculo de distancia genética entre los diferentes genotipos, se estimó basado en el modelo Kimura-2, utilizando la paquetería del MEGA® v7.018. En contraste se estimó el grado de similitud entre las secuencias, mediante matrices de identidad obtenidas con el software BioEdit®.

5.11 Hibridación *in situ* (HIS)

Las secciones de tejido de 3 µm en laminillas electrocargadas (Probe On Plus, Fisher Scientific, Pittsburg, USA) se calentaron en platina térmica a 60° C por 30 minutos, se desparafinaron en 3 pases de xilol de 5 minutos cada uno y se rehidrataron en gradientes de etanol (dos pases de 5 minutos en EtOH 100%, un pase de dos minutos en EtOH 95% y un pase de 2 minutos en EtOH 70%), seguido de un pase en amortiguador de automatización 1X (Automation buffer, Biomedica Corp., Foster City CA. USA) durante un minuto. Las reacciones de HIS se realizaron en una estación de trabajo Microprobe Manual Staining System (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) siguiendo un protocolo estándar, que consistió en: predigestión y digestión con pepsina al 0.25% (Fisher, Scientific, Pittsburg, USA) en amortiguador de automatización pH 2.0, prehibridación con formamida al 100% (Promega Corp. Madison, WI, USA), hibridación con 2.5ng/µl de la sonda de ADN específica para el VLB en solución de hibridación (condroitina sulfato 7.5%, solución salina de citratos/SSC 5X, amortiguador de fosfatos 50nM, agente bloqueador™ 0.25%, formamida 22.5%), lavados de alta astringencia con SSC al 0.5% y 0.2% (Promega Corp. Madison, WI, USA), bloqueo con amortiguador 1 (NaCl 0.15M, Tris HCl 0.1M, pH 7.5) suplementado con 0.3% de Triton X-100 (Fisher Scientific, Pittsburg, USA) y 1% de suero de ovino; la detección se realizó con una dilución 1:500 de anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina

(Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) y revelado con azul-nitro-tetrazolio (NBT) al 0.45% y 5-bromocresil-3-indolilfosfato (BCIP) al 0.35% (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) en amortiguador 2 ($MgCl_2$ 0.06M, NaCl 0.12M, Tris 0.1M pH 9.5) suplementado con Tween 20 al 0.4% (Hycel de México S.A. de C.V.) y Brij 35 al 0.25% (Fisher Scientific, Pittsburg, USA). La reacción se detuvo con agua destilada y se aplicó verde rápido (Hycel de México S.A. de C.V.) como colorante de contraste y medio de montaje permanente (Entellan, Merck, Hamburg, Germany). Cada protocolo de HIS contó con un control positivo y uno negativo. Así mismo, cada laminilla problema se procesó en ausencia de la sonda marcada como control interno de hibridación (anexo 5).

6. Resultados

Evaluación serológica de la infección por el VLB.

En los 724 plasmas evaluados por ELISA se detectaron 405 animales positivos, que representan un (55.9 %) y 319 animales negativos (44.1%). (cuadro 3).

Cuadro 3. Bovinos evaluados por serología para la detección de anticuerpos contra el VLB obtenidos de diferentes Estado de la República Mexicana.

	Aguascalientes	Coahuila	Guanajuato	Hidalgo	Puebla	Tlaxcala
Positivos	96 (49%)	92 (64%)	57(57%)	34(42.5%)	41(41%)	85(80%)
Negativos	99 (51%)	52(36%)	43(43%)	46(57.5%)	58(59%)	21(20%)
Total	195	144	100	80	99	106

Biometría hemática

De los 405 animales seropositivos evaluados para determinar linfocitosis, en 219 (54%) se presentó la alteración (figura 5 y cuadro 4).

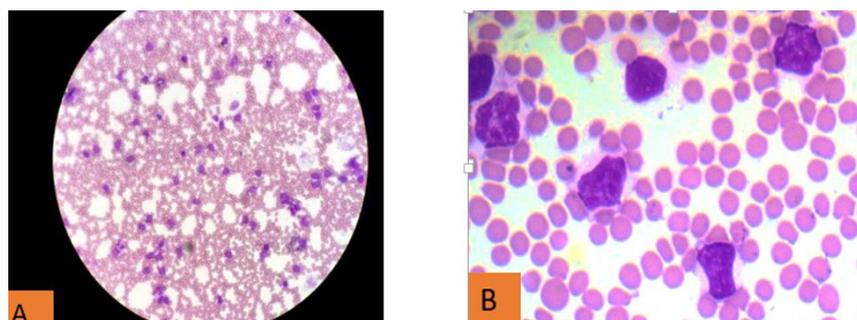


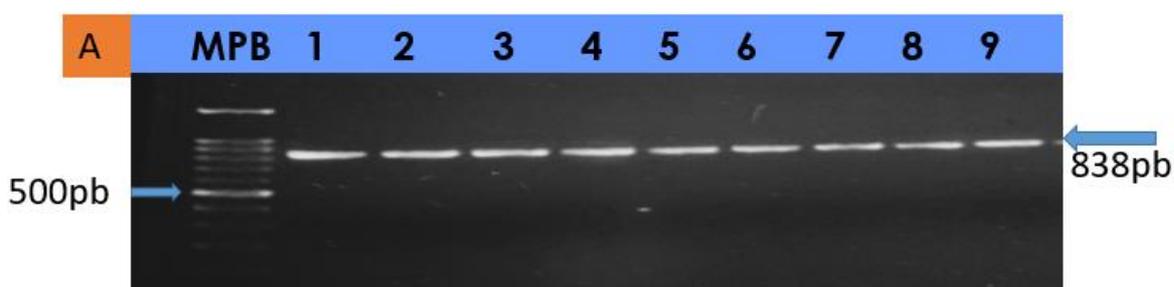
Figura 5. Revisión de frotis sanguíneo teñido con Diff-Quick, observados con un aumento de 400x (A) y 1000x (B) para la determinación de linfocitosis.

Cuadro 4. Animales seropositivos al VLB de diferentes regiones con linfocitosis y sin linfocitosis.

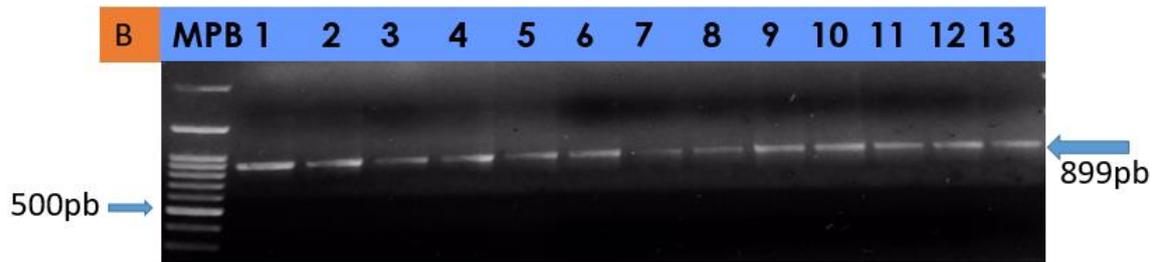
	ELISA(+)	Con linfocitosis	Sin linfocitosis
Hidalgo	34	16	18
Aguascalientes	96	50	46
Tlaxcala	85	40	45
Puebla	41	35	6
Guanajuato	57	33	24
Coahuila	92	47	45
Total	405	219(54%)	186(46%)

Amplificación de la región pX del VLB mediante PCR

Con el diseño de tres PCRs solapadas que generaron productos de amplificación de 838pb para la PCR 1, 899pb para la PCR 2 y 537pb para la PCR3, se logró obtener la región pX del VLB, la cual incluyó 4 genes accesorios *R3*, *G4*, *Rex* y *Tax* (figuras 6 A, B, C).



MPB = marcador de pares de bases; carril 1-9 muestras positivas de diferentes Estados del país. Electroforesis en gel de agarosa que muestra productos purificados de amplicones positivos en la PCR1 con un producto de 838 pb.



MPB = marcador de pares de bases; carril 1-13 muestras positivas de diferentes Estados del país. Electroforesis en gel de agarosa que muestra productos purificados de amplicones positivos en la PCR2 con un producto de 899 pb.

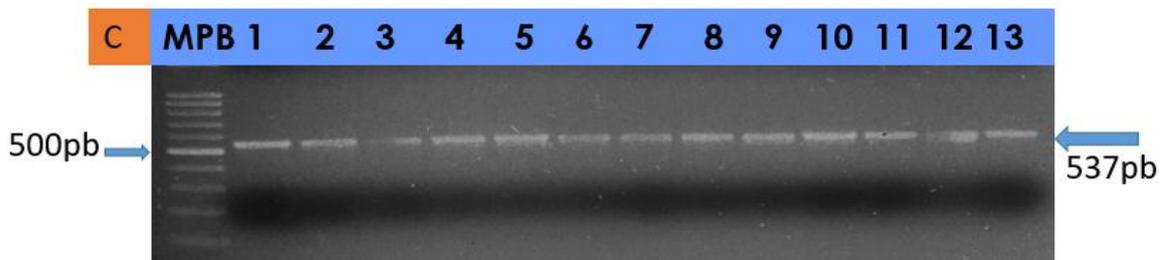


Figura 6 A, B y C. Amplificación por PCR de la región *pX* que incluye los genes *R3*, *G4*, *Rex* y *Tax* del VLB.

MPB = marcador de pares de bases; carril 1-13 muestras positivas de diferentes Estados del país. Electroforesis en gel de agarosa que muestra productos purificados de amplicones positivos en la PCR3 con un producto de 537 pb.

Se logró la amplificación por PCR de la región *pX* del VLB en 54 bovinos con linfocitosis y 54 sin linfocitosis de seis Estados de la República, adicionalmente se logró amplificar la región *pX* en 9 casos tumorales (cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados en bovinos de diferentes regiones donde se amplificó por PCR la región pX del VLB.

Estado	Muestras	PCR(+)	PCR(+)	PCR(+)	
	Probadas	Con	Sin	(-)PCR	Tumorales
	PCR	Linfocitosis	Linfocitosis		
Aguascalientes	20	10	8	2	
Coahuila	20	8	7	5	
Guanajuato	20	7	9	4	
Hidalgo	29	9	10	1	9
Puebla	20	10	10	0	
Tlaxcala	20	10	10	0	
Total	129	54	54	12	9

Posterior a las evaluaciones por PCR se identificaron 12 muestras negativas, que al ser evaluadas con la PCR para el gen SDHA solo en una de ellas se logró una amplificación positiva, indicando una mala calidad del ADN en el resto de las muestras (figura 7).

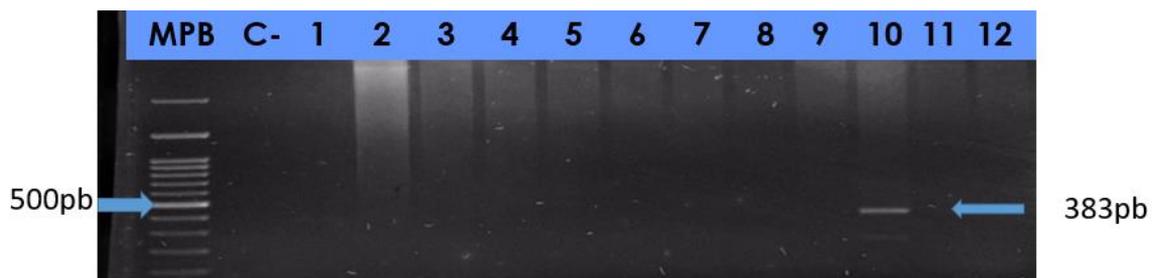


Figura 7. Amplificación por PCR del gen SDHA en muestras con resultados negativos en PCRs que detectan ADN proviral del VLB.

MPB = marcador de pares de bases; carril 1, se muestra el control negativo, carril 2-9, 11 y 12 muestras negativas, carril 10 muestra positiva. Electroforesis en gel de agarosa con un producto de amplificación de 383pb.

Secuenciación nucleotídica

Los productos de amplificación de las tres PCR realizadas permitieron ensamblar la región *pX* completa que consta de 1156pb, en un total de 30 muestras de bovinos de diferentes Estados de la República. La localización de la región *pX* se encuentra entre las posiciones 7017 y 8172 respecto a la secuencia con número de acceso K02120 del VLB referido por Sagata *et al.*, (1985) (figura 8 A y B).



Figura 8 A) Cromatograma visualizado con el programa Chromas® de una muestra secuenciada por el método Sanger. B) Valor de similitud encontrado en una muestra secuenciada comparada con otras secuencias disponibles en el GenBank utilizando el programa Blastn.

Filogenia

El árbol filogenético construido con 58 secuencias de una longitud de 1146pb de la región genética *pX* del VLB, incluyó 30 secuencias obtenidas en el presente estudio y 28 secuencias de referencia de 6 diferentes genotipos de la base de datos del GenBank.

El árbol obtenido asoció 23 secuencias del estudio con secuencias del genotipo 1, en contraste, 7 secuencias de este trabajo no fueron asociadas a ningún otro genotipo incluido en el estudio, presentando valores bajos de bootstraps.

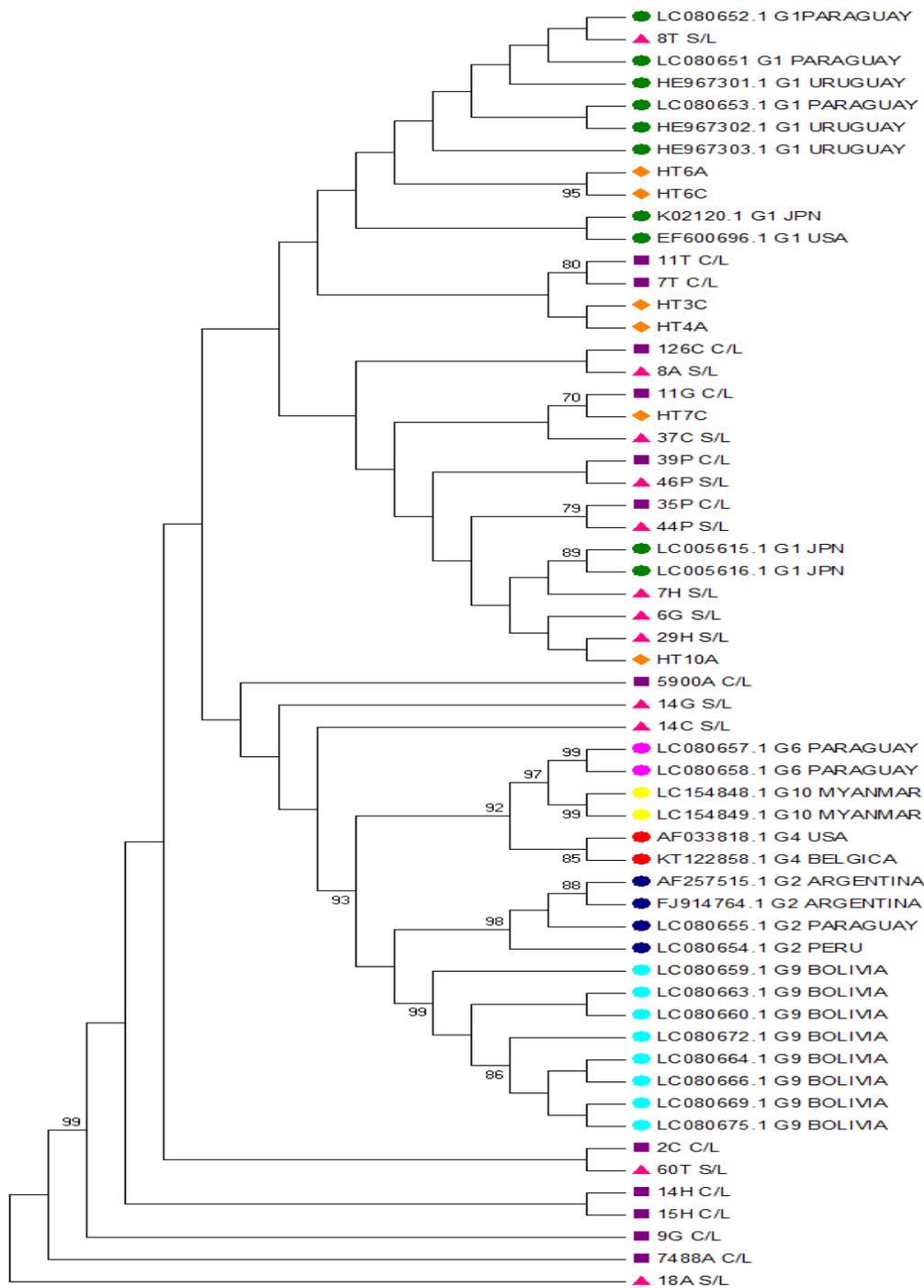
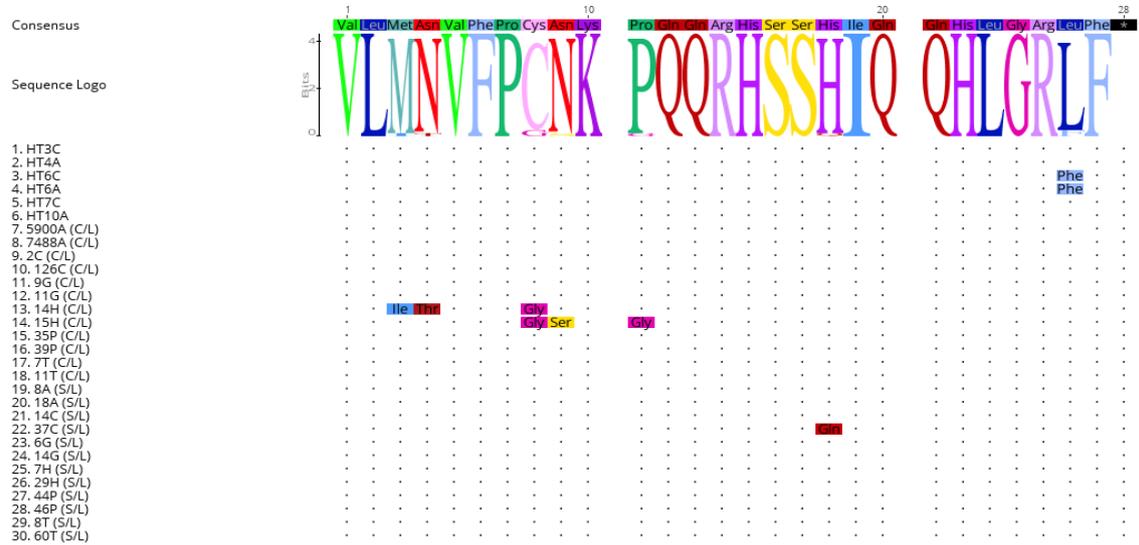


Figura 9. Árbol filogenético de 58 secuencias obtenidas de la región genética pX construidas con el algoritmo maximum likelihood utilizando un valor de 1000 bootstraps como soporte estadístico. Las secuencias de referencia se muestran con su número de acceso, genotipo correspondiente y país de origen. Las secuencias de este estudio se presentan con la inicial del Estado de la República de procedencia y caracterizados de acuerdo a las diferentes presentaciones: cuadro morado animales con linfocitosis, triángulo rosa animales sin linfocitosis y rombo naranja animales con tumores.

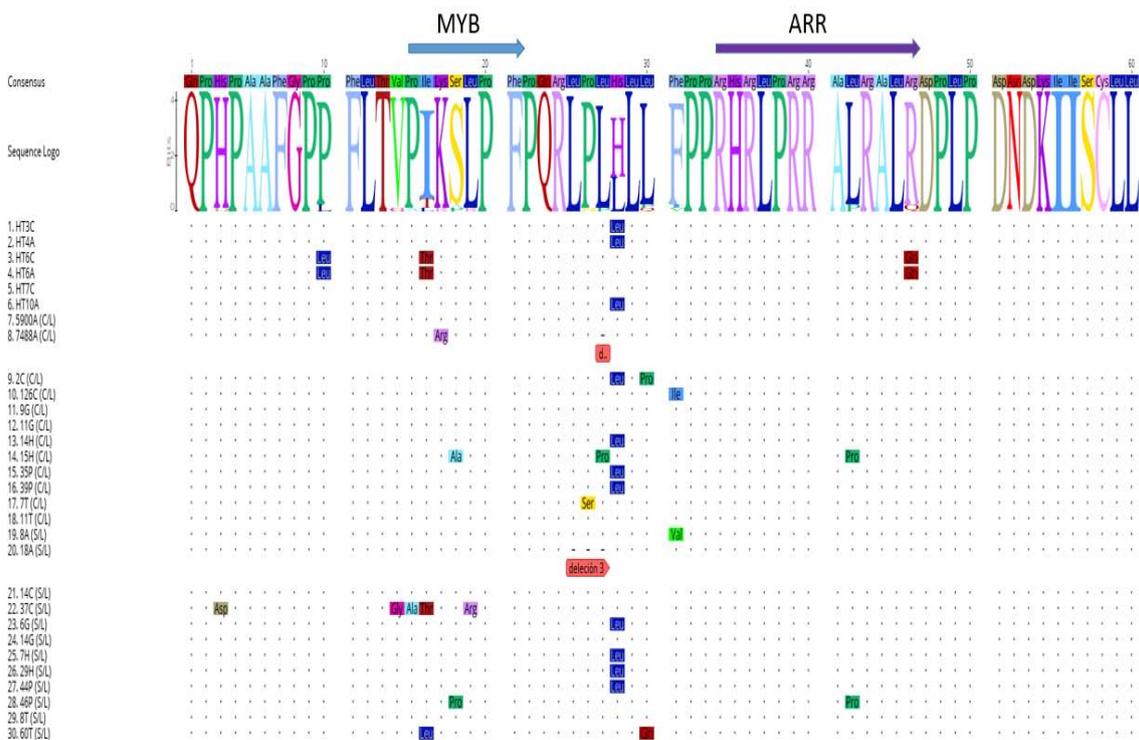
Análisis de secuencias

Se realizaron los alineamientos de la deducción de aminoácidos de las 30 secuencias obtenidas de los cuatro genes de la región *pX* con el programa WebLogo.



HT= tejidos tumorales, C/L bovinos con linfocitosis, S/L = bovinos sin linfocitosis

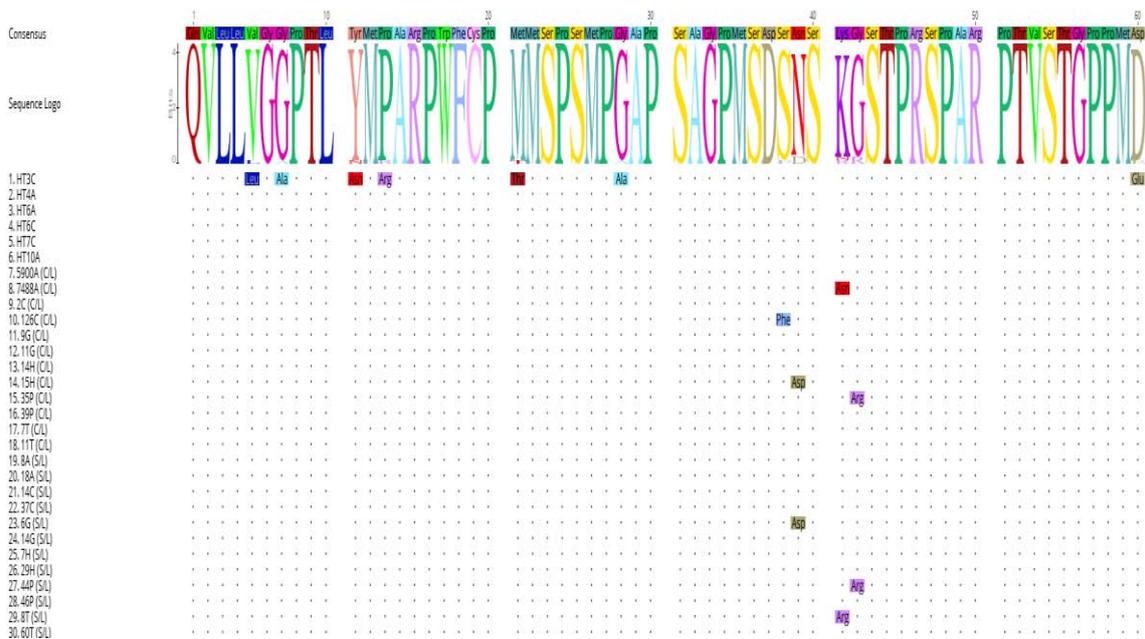
Figura 10. Alineamiento con Web logo de secuencias nucleotídicas deducidas a aminoácidos de la región *pX*, de un total de 30 animales infectados con el VLB. La imagen representa 28 aminoácidos del gen *R3*, observando 9 mutaciones no sinonimas en 5 de las secuencias analizadas de los tres grupos de estudio (vacas con linfocitosis, sin linfocitosis y tejidos tumorales).

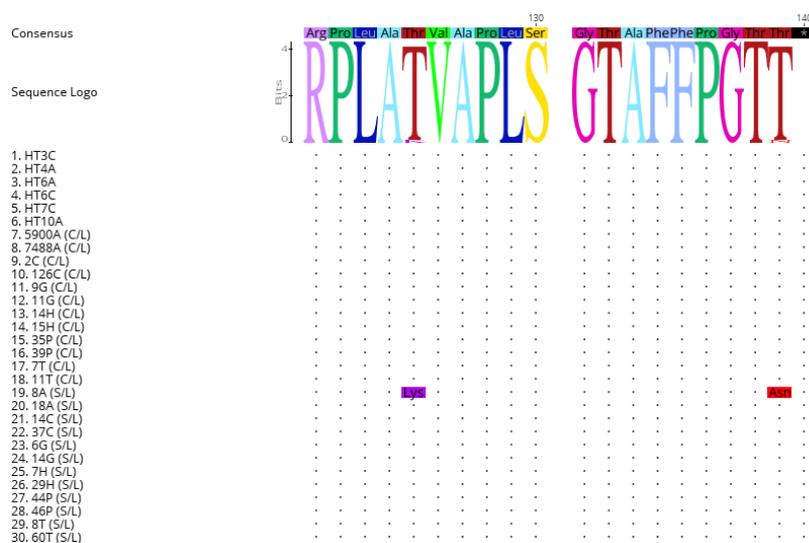
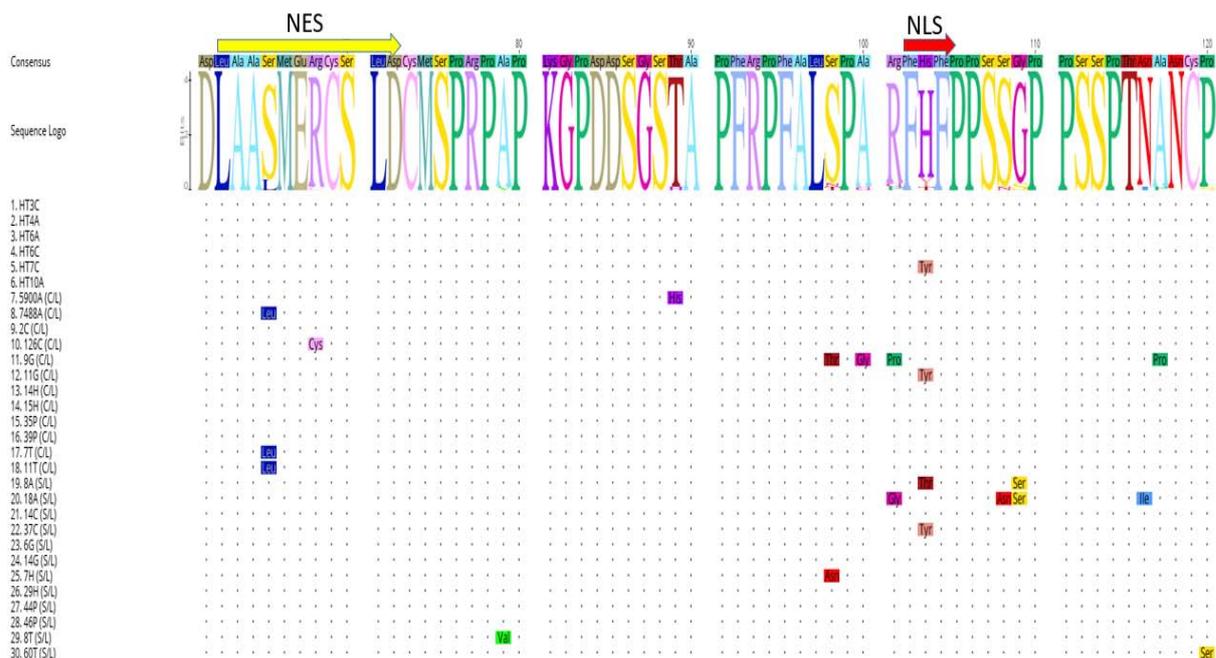




HT= tejidos tumorales, C/L bovinos con linfocitosis, S/L = bovinos sin linfocitosis

Figura 11. Alineamiento con Web logo de secuencias nucleotídicas deducidas a aminoácidos de la región pX, de un total de 30 animales infectados con el VLB. La imagen representa 82 aminoácidos del gen G4, el motivo MYB se muestra con la flecha azul y el núcleo rico en arginina que se dirige al sitio de unión de ARN (ARR) se muestra con la flecha color morado, se observan diferentes mutaciones no sinonimas en las secuencias analizadas en los tres grupos en los primeros 46 aminoácidos y dos secuencias con deleciones de un aminoácido (7488 A C/L) y de tres aminoácidos (18A S/L).

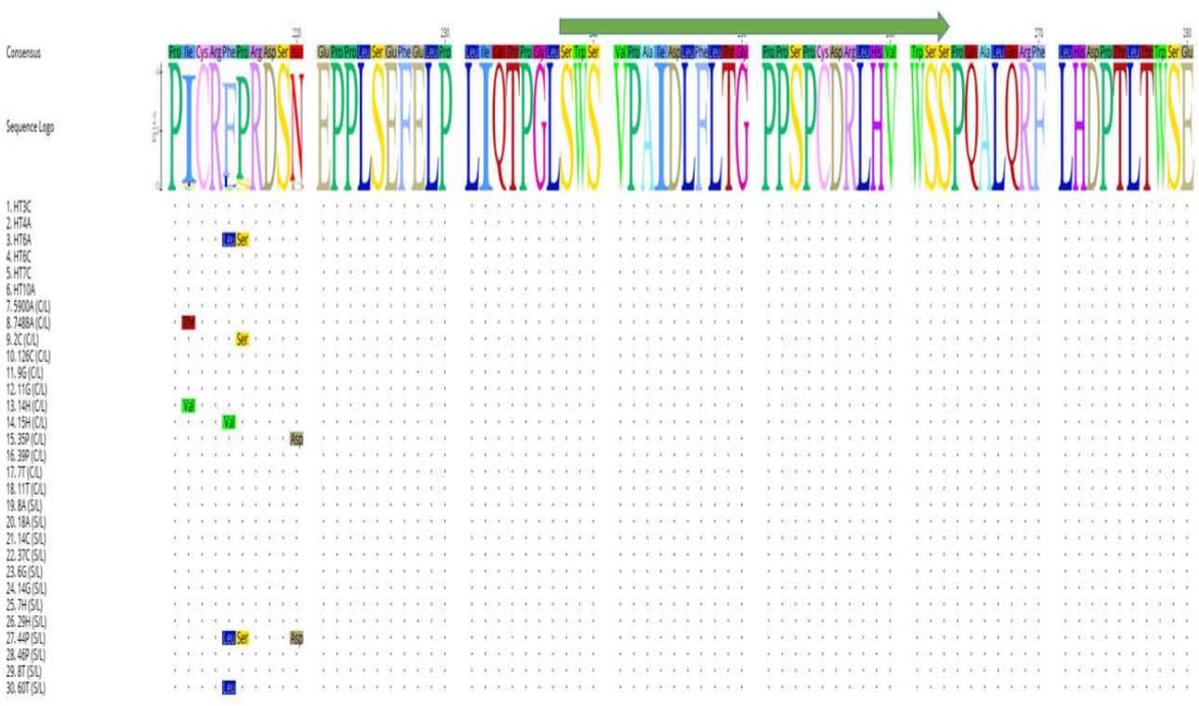
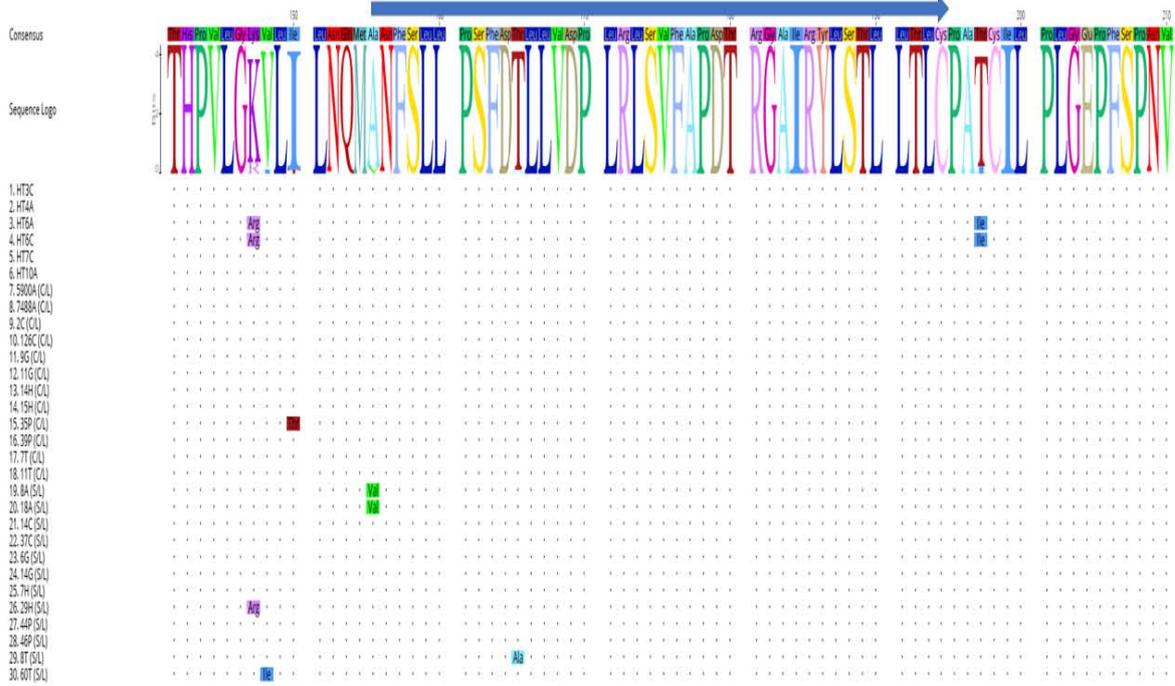


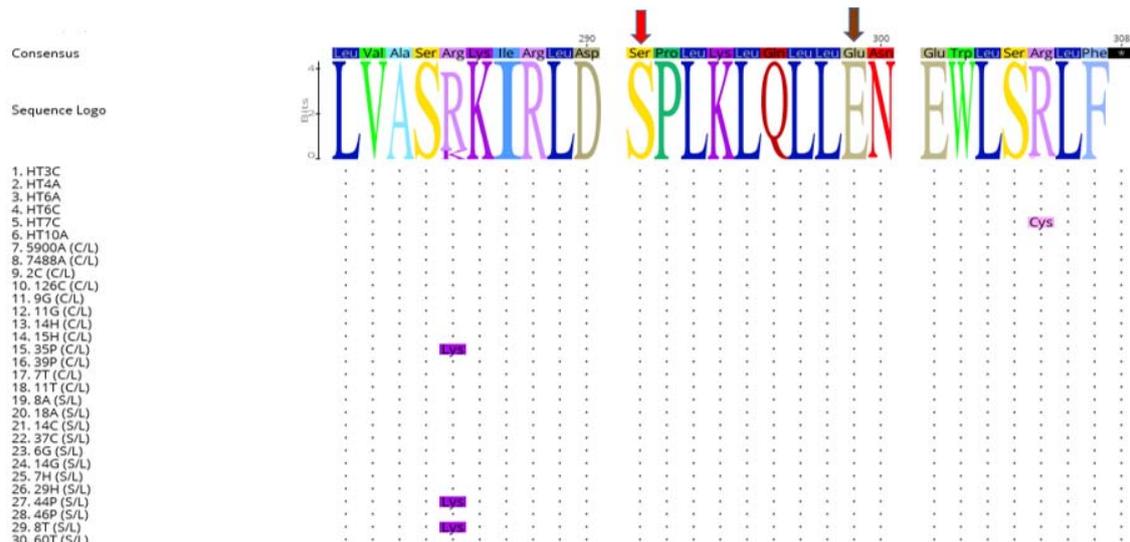


HT= tejidos tumorales, C/L bovinos con linfocitosis, S/L = bovinos sin linfocitosis

Figura 12. Alineamiento con Web logo de secuencias nucleotídicas deducidas a aminoácidos de la región pX, de un total de 30 animales infectados con el VLB. La imagen representa 140 aminoácidos del gen *REX*. La señal de exportación nuclear (NES) se muestra con una flecha amarilla y la señal de localización nuclear (NLS) se muestra con una flecha roja. Se observan 23 mutaciones no sinonimas principalmente en los animales con y sin linfocitosis.

LEUCINE- RICH ACTIVATION DOMAIN





HT= tejidos tumorales, C/L bovinos con linfocitosis, S/L = bovinos sin linfocitosis

Figura 13. Alineamiento con Web logo de secuencias nucleotídicas deducidas a aminoácidos de la región pX, de un total de 30 animales infectados con el VLB. La imagen representa 308 aminoácidos del gen *Tax*. Se observa un dominio de dedos de zinc con una flecha de color amarillo, un dominio de activación rico en leucina con flecha en color azul, la region entre los aminoácidos 240 a 265 en donde las mutaciones se han asociado con la actividad de transactivación de la proteína *Tax*, se señalan con flecha de color verde, los sitios de fosforilación con flechas de color rojo y con una flecha color café se señala una sustitución previamente descrita causante de un virus de replicación deficiente. Se observan 57 mutaciones no sinonimas en los tres grupos de estudio.

Matriz de similitud y distancia genética.

Se obtuvieron los rangos de similitud con el programa BioEdit® de las secuencias obtenidas de diferentes regiones del presente estudio por gen y por bovinos con linfocitosis, sin linfocitosis y tumor comparadas con secuencias de referencia del genotipo 1, observandose rangos de similitud muy altos entre las secuencias de este estudio y secuencias de referencia en el gen *tax* (100%) y los rangos más bajos se identificaron entre las secuencias en el gen R3 (89.2-100%)(cuadro 6).

Por otra parte se calculó la distancia genética de las secuencias de este estudio comparandolas con secuencias de referencia del genotipo 1, utilizando el programa Mega® v7.018. De forma similar a lo encontrado en los valores de similitud, los valores de menor distancia genética se identificaron en el gen *tax* (0%) y los de mayor en el gen R3 (11.9%)

Cuadro 6. Se muestran los porcentajes de similitud y la distancia genética, entre las secuencias obtenidas en este estudio por gen y por cuadro clínico o asintomáticas.

Gen	% Similitud	Distancia genética
R3 CL	92.8-100	0- 7.5
R3 SL	98.8-100	0-1.2
R3 Linfosarcoma	97.6-100	0-2.4
R3 (Genotipo 1)	89.2-100	0-11.9
G4 CL	97.1-100	0-1.7
G4 SL	93.9-100	0-3.9
G4 Linfosarcoma	95.5-100	0-4.6
G4 (Genotipo 1)	98.3-100	0-1.7
Rex CL	97.8-100	0-2.4
Rex SL	97.3-100	0-2.2
Rex Linfosarcoma	97.8-100	0-2.2
Rex(Genotipo 1)	100	0
Tax CL	98.1-100	0-1.9
Tax Sin Linfocitosis	98.1-100	0-1.9
Tax Linfosarcoma	98.2-99.7	0.2-1.8
Tax (Genotipo 1)	99.6-100	0-0.3

CL: con linfocitosis, SL: sin linfocitosis.

Los valores fueron calculados basados en 12 secuencias de animales con linfocitosis, 12 secuencias de animales sin linfocitosis y 9 secuencias de animales con linfosarcoma, comparadas con 10 secuencias del genotipo 1 de referencia disponibles en el GenBank que incluían los cuatro genes que componen la región *pX*.

Mutaciones sinónimas y no sinónimas

La proporción de mutaciones no sinónimas (dN) y sinónimas (dS) se determinó con el programa SNAP v2.1.1, entre las secuencias obtenidas de los diferentes grupos de estudio; se identificaron valores menores a uno en la mayoría de las proporciones calculadas por gen indicando selección negativa, por el contrario para el caso del gen G4 con un cuadro sin linfocitosis y con linfosarcoma se identificaron un mayor número de mutaciones no sinónimas por lo que la selección fue positiva. (cuadro 7).

Cuadro 7. Proporciones de mutaciones no sinónimas (dN) y mutaciones sinónimas (dS) de los diferentes genes que componen la región pX por grupo de animales con cuadros clínicos y asintomáticas.

Gen	dN	dS	Ratio
R3 CL	0.0632	0.0609	1.03
R3 SL	0.0150	0	0
R3 Linfosarcoma	0.0149	0.0639	0.23
G4 CL	0.0153	0.0152	1
G4 SL	0.0197	0.0175	1.1
G4 Linfosarcoma	0.0308	0.0228	1.3
Rex CL	0.0116	0.0241	0.481
Rex SL	0.0136	0.0169	0.804
Rex Linfosarcoma	0.0253	0.0045	5.6
Tax CL	0.0050	0.0218	0.229
Tax SL	0.0075	0.0211	0.355
Tax Linfosarcoma	0.0067	0.0190	0.352

CL: con linfocitosis, SL: sin linfocitosis.

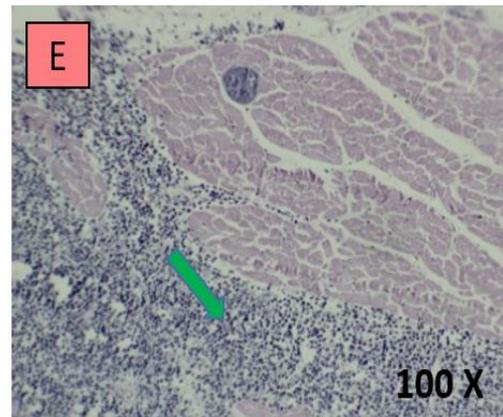
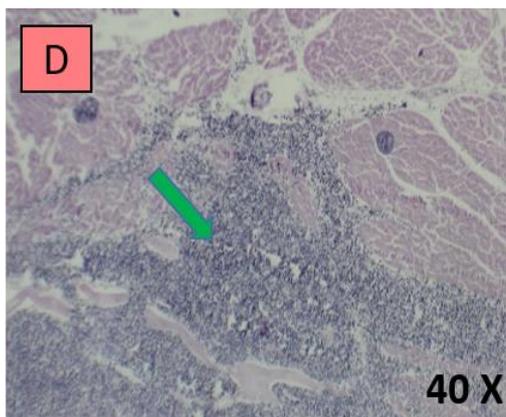
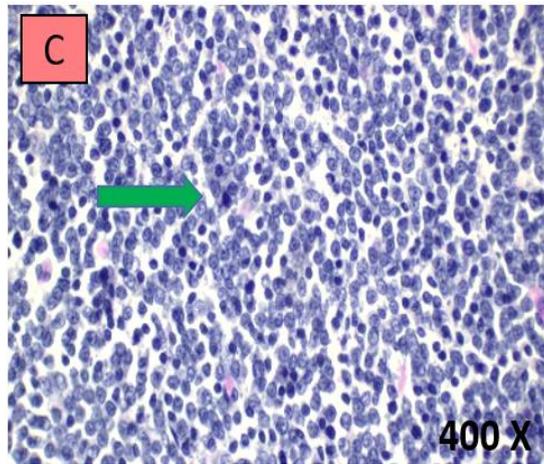
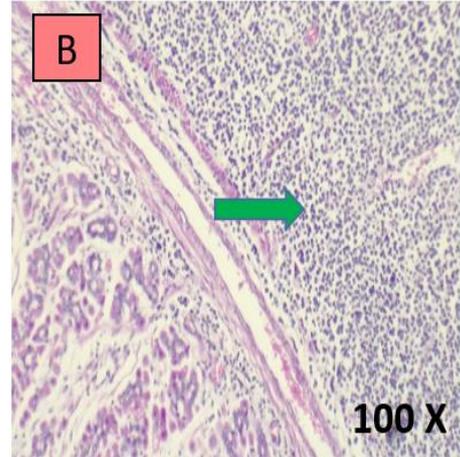
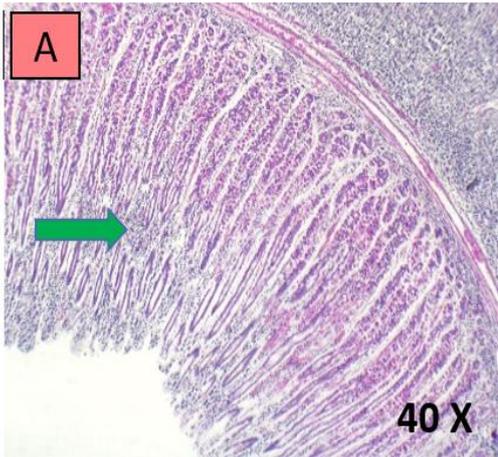
Histopatología

Se analizaron por medio de histopatología diferentes tejidos de 9 casos de vacas que a la necropsia presentaron lesiones tumorales, encontrando en todos los casos neoplasias asociadas a la infección por el VLB (cuadro 8 y figura 14 A, B, C, D, E, F).

Cuadro 8. Muestras recolectadas para histopatología, de diferentes órganos, de nueve casos de vacas con cuadro clínico tumoral.

Vacas	Órganos colectados			Presencia de linfosarcoma
1	Linfonodo	Abomaso	Intestino	√
2	Abomaso	Omaso		√
3	Abomaso			√
4	Abomaso	Corazón		√
5	Abomaso	Esófago		√
6	Abomaso	Corazón		√
7	Corazón	Linfonodo	Riñón	√
8	Corazón	Linfonodo	Riñón	√
9	Abomaso	Linfonodo		√

√ Presencia de linfosarcomas evidentes en todos los tejidos.



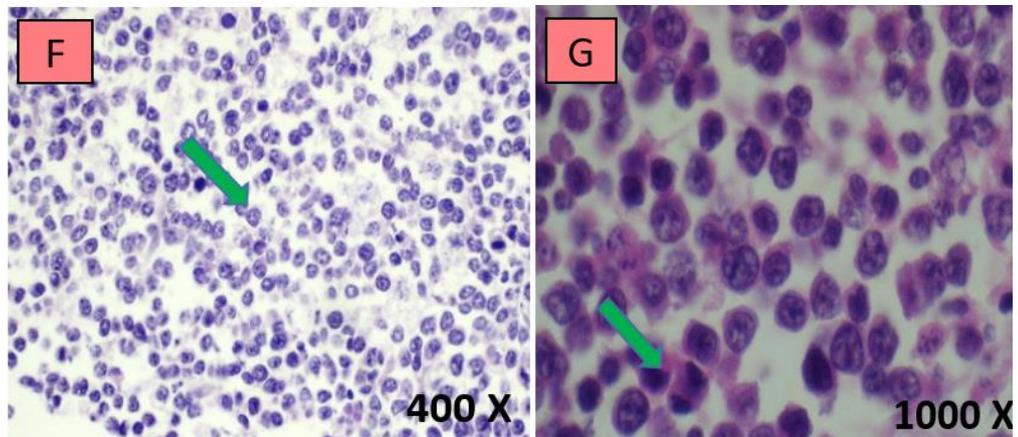


Figura 14. A, B y C. Cambios histopatológicos en abomaso, se observan abundantes agregados de células mononucleares principalmente linfocitos neoplásicos en la mucosa del abomaso (flecha), submucosa de abomaso (flecha), morfología de linfocitos neoplásicos con marcada anisocitosis y anisocariosis (flecha). D y E. Linfocitos neoplásicos localizados entre las fibras del miocardio (flecha). F y G. Linfoblastos con nucléolos prominentes y mitosis (flecha).

Hibridación *in situ*

Marcaje de la sonda para hibridación *in situ*

Se marcó la sonda con un kit comercial de un producto de PCR de 202 pb aproximadamente derivado del gen *pol* del VLB, el cual se utilizó como sonda para la técnica de HIS. La visualización del marcaje de la sonda se observa en la figura 15.

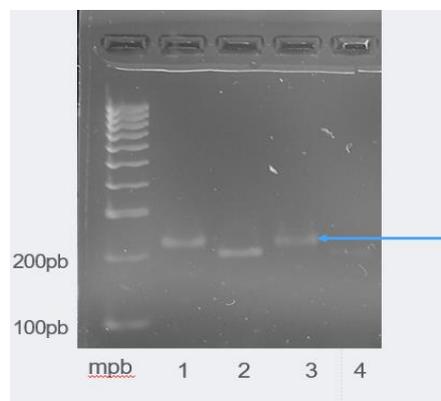


Figura 15. Marcaje de la sonda para la técnica de HIS con digoxigenina.

mpb = marcador de pares de bases; carril 1y 3 (flecha azul) bandas del producto marcado con digoxigenina para el VLB con un peso mayor a 200pb, y en los carriles 2 y 4 el producto sin marcaje. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

En los diferentes tejidos en los que se realizó el ensayo de HIS de 9 casos de animales con linfosarcoma 6 de ellos presentaron señal positiva en alguno de los tejidos probados (figura 16).

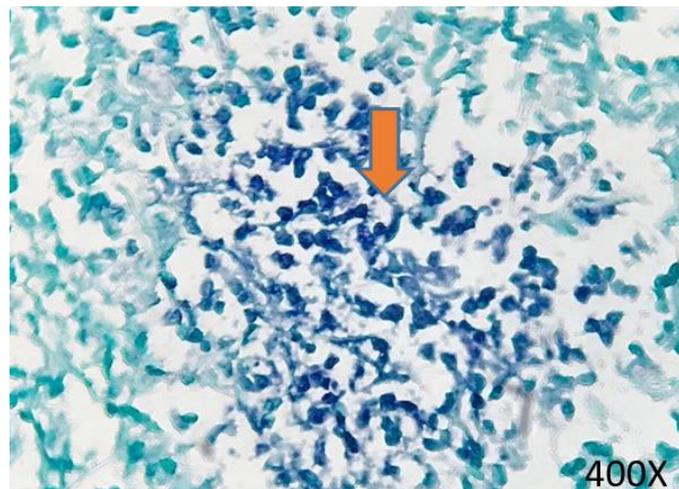


Figura 16. Señal de hibridación (flecha) en células neoplásicas localizadas en linfonodo de un animal con linfosarcoma, utilizando como medio de contraste la tinción verde rápido 400X.

7. Discusión

La prevalencia del VLB en todo el mundo varía ampliamente entre países reportándose prevalencias bajas del 5% en regiones como Camboya y Taiwán (MEAS et al., 2000) y 17% en Turquía (Burgu et al., 2005) por otro lado, prevalencias muy altas de 83.9% en Estados Unidos y 25.7% en Canadá (Bartlett et al., 2014). El número de hatos infectados en Canadá se ha descrito cercano al 89% (USDA, 2008).

Las pruebas serológicas se han usado extensamente en todo el mundo para identificar el ganado infectado por el VLB debido a su rapidez, rentabilidad y fácil interpretación (Bicka et al., 2000).

En el presente trabajo se seleccionaron aleatoriamente 724 bovinos destinados a la producción de leche de la raza Holstein Friesian provenientes de seis Estados de la República Mexicana, dichos animales fueron evaluados mediante serología con una prueba comercial de VMRD, identificando un total de 55.9% (n=405) de bovinos seropositivos, la seropositividad por Estados fue variable desde un 41% a un 80% lo que indica un alto grado de infección en los animales.

En la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo se han realizado diferentes estudios para determinar la seropositividad del VLB, como los reportados por Zavaleta et al., (2009) quienes describieron un 66% (n=80), Cancino (2017) describió un 60.4% (n=48) y en el presente trabajo se encontró un 42.5% (n=80) mostrando un alto grado de seropositividad en dicha cuenca.

La mayor seropositividad se encontró en un hato lechero del Estado de Tlaxcala identificando un 80% (n=100) lo cual podría estar relacionada a longevidad de los animales en dicho hato. Esto concuerda con lo descrito por Zaghawa y Beier 2002, quienes reportaron una seropositividad del 72.8% en bovinos mayores lo que podría estar asociado a las condiciones de alojamiento, contacto cercano con el resto de los animales lo cual favorece la probabilidad de transmisión.

Mediante la prueba de PCR se pueden detectar animales infectados que aún no seroconvierten, en infecciones recientes o antes de que se desarrollen anticuerpos o por reacciones débiles en la prueba de ELISA (Evermann, 1997). La integración del provirus del VLB se ha identificado en diferentes estudios a partir de leucocitos de sangre periférica (Beirer, Blankenstein, 2001). Mediante PCR se determinó que 117 bovinos fueron

positivos de un total de 129 animales identificados como seropositivos, en los animales negativos a la PCR del VLB se determinó que solo uno amplificó para el gen endógeno SDH, lo que indicó una mala calidad en el ADN de estas muestras descartando este grupo de animales los resultados en la prueba de PCR fueron similares a los resultados obtenidos en la prueba de ELISA.

Con base en un conteo absoluto de 10000 linfocitos/ mm³ los animales fueron diagnosticados con linfocitosis, de 405 bovinos seropositivos al VLB, un 54% (n=219) resultaron con linfocitosis, estos resultados difieren de los reportados por Khudhair *et al.*, (2016), quienes reportan un 29% de animales con linfocitosis y 70% sin linfocitosis persistente, lo que podría asociarse a un nivel más bajo de infección dado que solo un 7% de animales de este estudio fueron seropositivos, comparado con el presente trabajo donde se encontró un total de 55.9% de seropositividad, Zavaleta en 2009 reportó 77.7% de animales con linfocitosis persistente en vacas seropositivas en el estado de Hidalgo (Tizayuca), el alto porcentaje de animales con linfocitosis no es posible asociarlo en todos los casos a la infección por el VLB, debido a que para determinar linfocitosis persistente se requieren al menos tres muestreos continuos (Rajão *et al.*, 2014), lo cual no se realizó en el presente estudio.

Los resultados de la revisión histológica de diferentes tejidos procedentes de nueve casos de vacas con cuadro clínico tumoral se identificaron en todos los casos la presencia de linfocitos y linfoblastos con características neoplásicas, observándose células redondas, grandes, con escaso citoplasma, marcada anisocariosis y anisocitosis, nucléolos prominentes y de 3-5 mitosis por campo con el objetivo 1000X. En el ganado bovino se han reportado hasta un 65% de casos de linfomas encontrados al sacrificio con presencia de células B grandes (Meuten, 2017). En 2012, Lee *et al.*, (2012) describieron un caso de linfoma multicéntrico en una Alpaca detectada positiva a anticuerpos contra el VLB mediante las pruebas de ELISA y AGID y también se probaron células neoplásicas de dicho animal con una prueba de PCR *in situ* (IS-PCR) presentando reacción positiva en algunos de los tejidos probados, se describió en la histopatología de este animal células redondas, moderada anisocariosis, núcleos redondos grandes y de 2 a 5 figuras mitóticas por campo, dichas células fueron encontradas en hígado, riñón y omento concluyendo con un diagnóstico de linfoma. Okada *et al.*, 2005, describieron lesiones macroscópicas y microscópicas en ovejas infectadas de forma experimental con el VLB, en tejidos como abomaso, intestino, corazón, riñón, linfonodos, donde proliferaron y se infiltraron células neoplásicas alterando la arquitectura

de dichos órganos, describen células linfocíticas, linfoblasticas y mitosis en dichas neoplasias. Duncan *et al.*, 2005, reportaron la detección de ADN proviral en linfocitos de timo, por medio de IS-PCR confirmando la infección por el VLB. En el presente estudio la confirmación de la presencia del VLB en los linfomas de órganos como linfonodos, corazón, abomaso, omaso, intestino y riñón fue utilizando la técnica de HIS demostrando señal positiva en dichos tejidos.

La mayoría de los trabajos filogenéticos del VLB se han centrado principalmente en el análisis del gen *env*, particularmente en la región gp51 por su importancia como ligando y antígeno entre otras funciones (Callebaut *et al.*, 1993; Mamoun *et al.*, 1990). En 2007 se realizó un estudio detallado que identificó 7 genotipos a partir del análisis del gen *env* (Rodriguez *et al.*, 2009). Un nuevo genotipo, el 8 fue descrito por primera vez en Croacia y posteriormente distribuido en otras regiones geográficas (Balić *et al.*, 2012), finalmente los genotipos 9 y 10 se describen en 2016 en Bolivia (Polat *et al.*, 2016), Tailandia (Lee., 2016) y Myanmar (Polat *et al.*, 2017). Recientemente estudios filogenéticos a partir de secuencias completas del VLB, pudieron identificar los genotipos 1, 2, 4, 6, 9 y 10 usando las secuencias disponibles en las bases de datos (NCBI y DDBJ)(Polat *et al.*, 2016, 2017). En este estudio se realizó un análisis filogenético utilizando los genes (*R3*, *G4*, *REX* y *TAX*) de la región *pX* la cual incluyó 1156nt, encontrando que 23 de las secuencias obtenidas se asociaron con el genotipo 1. Estas secuencias derivaron de 7 bovinos con linfocitosis, 10 sin linfocitosis y 6 tumorales, por otro lado, 7 secuencias derivadas de 5 bovinos con linfocitosis y 2 sin linfocitos se agruparon en otro clado, en el cual no se encontraron secuencias de algún genotipo de referencia incluidos en el estudio filogenético. Esta información muestra por un lado que el genotipo 1 del VLB está ampliamente distribuido en el país lo que coincide con lo reportado por Cancino *et al.*, (2017) siendo importante recalcar que este núcleo de secuencias incluyeron los tres grupos categorizados en este estudio y que se distribuyeron de forma heterogénea en el árbol filogenético. Por otro lado 7 secuencias no pudieron ser asociadas a un genotipo, lo que podría indicar una variabilidad genética que pudiera sugerir la presencia de un genotipo diferente, sin embargo, los valores de bootstraps no soportan esta aseveración, adicionalmente, en el árbol no se incluyeron secuencias de los genotipos 3, 5, 7 y 8, y aunado a que la región *pX* no es frecuentemente utilizada para estudios filogenéticos, podría ser la razón por la que no fue posible establecer la identidad genética de dichas secuencias, por lo que se sugiere considerar esta región junto con

el gen *env* para una mejor clasificación genética del virus. Dada la relación comercial que existe entre México, EUA y Canadá es posible explicar la presencia del genotipo 1 en el ganado lechero nacional y que por falta de secuencias de la región *pX* del genotipo 3 el cual también se ha descrito en EUA no fue posible establecer la posible presencia de este infectando bovinos del país.

Para determinar si la variabilidad genética que existe entre diferentes secuencias del VLB obtenidas de leucocitos de sangre periférica se asoció a una diferente fase de infección, se analizaron tres grupos de estudio de bovinos infectados con presencia de linfocitosis, sin linfocitosis y con presencia de tumores. En el primer análisis que incluyó la similitud entre las secuencias los rangos fueron de 92.8% a 100% en toda la región *pX*, sin embargo, los genes *Tax* y *Rex* presentaron los valores inferiores mas altos de similitud (98.1% para *Tax* y 97.3% para *Rex*) y los valores inferiores mas bajos de similitud para los genes *R3* y *G4* (92.8% para *R3*, y 93.9% para *G4*) independientemente de la fase de infección. Lo que coincide con lo descrito por Moratori (2012) donde reporto un 99.4% a 100% para el gen *Rex* y de 96.4% a 99.4% para el gen *Tax*. Panei *et al.*, en 2013, reportaron valores de distancia genética para el gen *Tax* de 0 a 6.1%, para *Rex* de 0 a 9.4%, de 0-12.1% para *R3* y finalmente de 0 a 6.5% para el gen *G4*, los que son parecidos a los encontrados en el presente trabajo para el gen *R3* de 0 a 7.5% y para *G4* de 0 a 4.6%, sin embargo, los valores de distancia genética en los genes *Tax* (0 a 1.9%) y *Rex* (0 a 2.4%) fueron más bajos, lo que también concuerda con los valores de similitud encontrados en estos genes.

La proteína *R3* consta de un total de 44 aminoácidos y está constituida por una porción hidrofílica en el extremo N-terminal, seguida de una región hidrofóbica. Moratorio *et al.*, 2013, describieron codones de paro prematuros en dos secuencias obtenidas a partir de lesiones tumorales en el gen *R3*, en el presente trabajo no se encontró ningún codón de paro prematuro en las 30 secuencias analizadas, sin embargo, se identificaron 9 mutaciones no sinónimas en 5 secuencias en los tres grupos de estudio, lo cual no ha sido descrito hasta la fecha ni se han dilucidado las posibles implicaciones biológicas que estas mutaciones pudieran tener (figura 10).

Aunque no se han aclarado las funciones de las proteínas *G4* y *R3* completamente, estas son de gran importancia en la propagación viral *in vivo* (Lefèbvre *et al.*, 2002). Dentro de las funciones que se han descrito para la proteína *G4* se destaca su potencial oncogénico, esta proteína incluye un tramo amino terminal de residuos hidrofóbicos, seguidos de

posibles sitios de corte proteolítico y una región rica en argininas situada en el centro de la proteína (Alexandersen et al., 1993)(figura 11). Dicha región es clave en la interacción de G4 con farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS)(Lefebvre et al., 2002). Esta enzima participa en la ruta que conduce a la lipidación de una gran variedad de proteínas laminas nucleares, Ras y otras proteínas reguladoras de unión (GTP), varias quinasas y fosfatasas (Lefebvre et al., 2002), la interacción G4-FPPS ha sido demostrada en la transformación celular, mutaciones en la alfa hélice de la región rica en arginina de G4 impide la inmortalización de células primarias y la inducción de tumores en ratones atímicos (Lefebvre et al., 2002), por lo que la interrupción de dicha interacción podría alterar el proceso de oncogénesis. En las secuencias del presente estudio solo se observaron cuatro mutaciones en cuatro secuencias en la región rica en arginina en los tres grupos de estudio (figura 11), lo que indica la alta conservación de dicho sitio, lo cual puede ser necesario para que la proteína pueda ejercer su función en la tumorigénesis, es importante resaltar que se identificaron 2 de estos cambios en la última arginina de dicho sitio, en dos tejidos tumorales (abomaso y corazón), sin embargo, no hay información que nos permita entender que implicaciones tiene este hallazgo, aunque no se tiene la certeza de que sea la misma secuencia en todos los casos de tejidos con tumores. En contraste, se identificó la presencia de un número elevado de mutaciones no sinónimas entre el motivo MYB y el núcleo rico en argininas, esta gran cantidad de cambios acumulados no se han descrito en la literatura para este gen, adicionalmente se observaron dos secuencias con deleciones de un aminoácido (7488 A C/L) y de tres aminoácidos (18A S/L) lo que coincide con lo descrito por Murakami et al., (2016) quienes reportaron una deleción de 4 aminoácidos en el gen G4 que pudieron asociar con una disminución de la producción y replicación viral realizando análisis *in vitro*, el alto número de cambios identificadas en esta región podrían estar impactando la replicación viral y que para poder demostrarlo sería necesario realizar estudios *in vitro*.

La proteína Rex facilita la exportación de ARN virales entre el núcleo y el citoplasma mediante la señal de localización nuclear (NLS) y la señal de exportación nuclear (NES) (Choi et al., 2005). La NLS dirige a la proteína Rex hacia el núcleo excepto cuando se une al ARN viral. Esta unión enmascara la NLS permitiendo que la NES dirija este ARN al citoplasma a través de los poros nucleares (Kim, 1996; Zapp, 1991). En las secuencias obtenidas en el estudio se observaron un total de 10 mutaciones no sinónimas (figura 12), 4 para la región NES todas en bovinos con linfocitosis

y 6 para la región NLS de las cuales 3 son de bovinos sin linfocitosis, 2 con linfocitosis y una en un animal con cuadro tumoral, es interesante resaltar que las mutaciones en la región NES solo se identificaron en bovinos con linfocitosis, y en NLS en bovinos de los tres grupos, es recomendable estudiar más a fondo sobre el posible impacto de las mutaciones en los dos sitios.

El gen *Tax* se involucra en la transcripción de genes virales y celulares y puede permitir transformación oncogénica a través de la inhibición de las vías de reparación del ADN en células infectadas (Zhao *et al.*, 2007). En estudios realizados sobre la proteína *Tax* han descrito la presencia de un motivo de dedos de zinc, un motivo transactivador y dos sitios de fosforilación. En un estudio realizado con mutantes de *Tax* las cuales presentaron sustituciones entre los aminoácidos 240 y 265, la mutante con una sustitución única (E303K) resultó ser defectuosa en la replicación (Den Breoeke *et al.*, 1999) a su vez la capacidad de estimular la transcripción dirigida a LTR, fue menor en comparación con la región *Tax* sin sustituciones (Tajima & Aida, 2000). En las secuencias del presente trabajo se presentaron solo 4 mutaciones en el motivo de dedos de zinc. Los sitios de fosforilación estuvieron conservados en todas las secuencias de igual forma los sitios asociados con la transactivación y solo se observaron tres mutaciones en el dominio rico en leucinas en tres animales sin linfocitosis todos las sustituciones observadas en la proteína *Tax* no estuvieron asociadas a las regiones previamente descritas que impactan en la transcripción del virus (figura 13). Estudios previos han revelado que con distintos mecanismos genéticos y epigenéticos es posible el silenciamiento del gen *Tax* el cual es fundamental para la no progresión del proceso tumoral (Merimi *et al.*, 2007). En el análisis del gen *Tax* en las secuencias del presente estudio, este gen presentó un alto grado de conservación y no fue posible identificar patrones de secuencias en especial en los animales con linfocitosis y tejidos tumorales que pudieran asociarse con el desarrollo de la transformación celular.

Un método para determinar la restricción evolutiva de genes superpuestos es medir la tasa de sustituciones. En la superposición de marcos de lectura un cambio sinónimo en un gen puede no ser neutral en el otro. La selección purificadora, también conocida como selección negativa, es un tipo de selección natural en la cual la diversidad genética disminuye a medida que un valor de rasgo particular (frecuencia de fenotipo) es estabilizado en la población. En comparación, la selección positiva aumenta la frecuencia de ciertas variaciones y ocurre cuando el equilibrio en la población no ha sido alcanzado (Zhao *et al.*, 2007b). La

proporción de sustituciones sinónimas/no sinónimas (dN/dS) en las secuencias de este trabajo para los tres grupos de bovinos analizados en el gen *Tax*, *R3* (bovinos sin linfocitosis y con cuadro tumoral) y *Rex* (bovinos con y sin linfocitosis) se determinó una selección negativa; resultados similares en los genes *Tax* y *Rex* fueron descritos por McGirr y Buehuring (2006). Zhao *et al.*, (2007) reportaron una selección negativa para el gen *Tax* del VLB que podría asociarse a que un mayor porcentaje de su secuencia en este gen no está superpuesta, comparada con los otros genes de la región *pX*. También se ha encontrado que *Tax* está más conservado que *Rex* en el virus de leucemia de células T de primates I y II, que se encuentran en el mismo género que el VLB. Esto es consistente con la expectativa de que *Tax* podría ser la proteína reguladora más importante para el comportamiento de los deltavirus. En el caso de las secuencias obtenidas para el gen *R3* (bovinos con linfocitosis), *Rex* (con linfosarcoma) además de todas las secuencias obtenidas de bovinos en el gen *G4* del VLB se determinó una selección positiva lo que indicaría que el virus trata de modificar su genoma y de esta forma evitar los mecanismos de inmunidad innata del hospedero entre ellos APOBEC (Nakano *et al.*, 2017).

8. Conclusiones.

1. Mediante serología y PCR se pudieron identificar bovinos infectados con el VLB de diferentes regiones del país.
2. Se amplificó la región *pX* completa del VLB de 30 bovinos con linfocitos, sin linfocitosis y de tejidos tumorales.
3. La mayoría de las secuencias nucleotídicas obtenidas se asociaron con secuencias del genotipo 1 del VLB.
4. El uso de PCR e histopatología permitió identificar en los linfosarcomas la presencia del VLB, y con la hibridación *in situ* se confirmó la presencia del virus en 6 de 9 casos con linfosarcomas.
5. Aunque se identificaron sustituciones en algunos residuos de los 4 genes de la región genética *pX* no se pudieron asociar a una fase de infección en particular.

9. Referencias

- Adam, E., Kerkhofs, P., Mammerickx, M., Kettmann, R., Burny, A., Droogmans, L., & Willems, L. (1994). Involvement of the cyclic AMP-responsive element binding protein in bovine leukemia virus expression in vivo. *J Virol*, *68*, 5845–5853.
- Alexandersen, S., Carpenter, S., Christensen, J., Storgaard, T., Viuff, B., Wannemuehler, Y., ... Roth, J. A. (1993). Identification of alternatively spliced mRNAs encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus. *J Virol*, *67*, 39–52.
- Bai, L., Takeshima, S.-N., Isogai, E., Kohara, J., & Aida, Y. (2015). Novel CD8 + cytotoxic T cell epitopes in bovine leukemia virus with cattle. *Vaccine*, *33*, 7194–7202.
- Balić, D., Lojkić, I., Periškić, M., Bedeković, T., Jungić, A., Lemo, N., Madić, J. (2012). Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. *Archives of Virology*, *157*, 1281–1290.
- Barez, P. Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutiérrez, G., Willems, L. (2015). Recent advances in BLV research. *Viruses*, *7*.
- Bartlett, P. C., Sordillo, L. M., Byrem, T. M., Norby, B., Grooms, D. L., Swenson, C. L., Erskine, R. J. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *244*, 914–922.
- Beirer D, Blankenstein P, M. O. et al. (2001). Detection and Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequensis. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, *114*: 252–2, 252-.
- Bendixen, H. J. (1965). Bovine enzootic leukosis. *ADV.VET.SCI*, 129–204.
- Bicka, L., Mak, J. K. U. Ž., Rola, M., & Beier, D. (2000). Detection of Genetic Diversity Among Bovine Leukemia Virus Population By Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis, 205–212.
- Burny A, Bruck C, Cleuter Y, Couez D, Deschamps J, Gregoire D, Ghysdael J, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, et al. (1985). Leukosis., Bovine leukaemia virus and enzootic bovine, 133–144.
- Burny A1, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, van den Broeke A, Willems L, T. R. (1988). Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet Microbiol.*, *17*, :197-218.
- Cadavid. (2012). *Impacto del virus de la leucosis bovina en la produccion de leche. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.*

- Cancino (2016). Detección molecular y genotipificación del virus de la leucemia bovina en los estados de Hidalgo Jalisco y México. *Tesis de Licenciatura, FESC, UNAM.*
- Chamizo, E. G. (2005). Leucosis Bovina Enzootica. *REVET, Vol 6 No 7., Revisión.*
- Choi, E., & Hope, T. J. (2005). Mutational Analysis of Bovine Leukemia Virus Rex : Identification of a. *Society, 79, 7172–7181.*
- Coulston, J., Nail, H., Brandon, R., Kumar, S., Khan, S., Daniep, R. C. W., & Lavin, M. F. (1990). Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA : comparison with other isolates, (1990), 1737–1746.
- Den Breoeke, A., Bagnis, C., Ciesiolka, M., Cleuter, Y., Gelderblom, H., Kerkhofs, P., ... Burny, A. (1999). In vivo rescue of a silent tax-deficient bovine leukemia virus from a tumor-derived ovine B-cell line by recombination with a retrovirally transduced wild-type tax gene. *J Virol, 73, 1054–1065.*
- Derse, D. (1987). Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. *Journal of Virology, 61, 2462–2471.*
- Diario Oficial de la Federación. ACUERDO mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. 2016. Available at:<http://sagarpa.gob.mx/normateca/normateca2/Forms/DispForm.aspx?ID=2367>.
- El Hajj, H., Nasr, R., Kfoury, Y., Dassouki, Z., Nasser, R., Kchour, G., Bazarbachi, A. (2012). Animal models on HTLV-1 and related viruses: What did we learn. *Frontiers in Microbiology, 3(SEP), 1–18.*
- Evermann JF, J. M. (1997). Laboratory diagnostic tests for retroviral infections in dairy and beef cattle. *Vet Clin N Am Food Animal Pract, 13: 87–106.*
- Felmer, R., & Zuniga, J. (2006). Diagnosis and typing of bovine leukaemia virus using a PCR-RFLP test on DNA extracted from somatic cells in milk. *Archivos de Medicina Veterinaria, 38, 253–257.*
- Fenner F. (2011). *Virología Veterinaria, 264–266.*
- Ferrer JF, Kenyon SJ, G. P. (1981). Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. *Science, 213(4511), 1014–6.*

- Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Willems, L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4, 18.
- González, E., Oliva, G., Valera, A., Bonzo, E., Licursi, M., & Etcheverrigaray, M. (2001). Leucosis Enzoótica Bovina: Evaluación De Técnicas De Diagnóstico (Id, Elisa-I, Wb, Pcr) En Bovinos Inoculados Experimentalmente. *Veterinaria*, 12, 12–20.
- Gutiérrez, G., Alvarez, I., Merlini, R., Rondelli, F., & Trono, K. (2014a). Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 82.
- Gutiérrez, G., Rodríguez, S. M., De Brogniez, A., Gillet, N., Golime, R., Burny, A., ... Willems, L. (2014b). Vaccination against retroviruses: The bovine leukemia virus paradigm. *Viruses*, 6, 2416–2427.
- Haas, L., Divers, T., & Casey, J. W. (1992). Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *Journal of Virology*, 66, 6223–5.
- Hernández, B.R.J;Mar. C.R.A;Zavaleta H.J .N; Barrientos P.R;Leyva, G .V.H; Fausto, R. (2006). Leucosis enzoótica bovina. *Revista de Ciencia Biodiversidad y Tecnología Agropecuaria, Agropecus*, 14–36.
- Janice M. Miller, M. J. V. der M. (1982). No TitleBovine Leukosis — Its Importance to the Dairy Industry in the United States. *J Dairy Sci.*, ;65:21.
- Jimba, M., Takeshima, S. N., Murakami, H., Kohara, J., Kobayashi, N., Matsuhashi, T., Aida, Y. (2012). BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Vet Res*, 8, 167.
- Kahn, B. A. (2007). *Manual Merck de Veterinaria*.
- Katoh, I., Yasunaga, T., & Yoshinaka, Y. (1993). Bovine leukemia virus RNA sequences involved in dimerization and specific gag protein binding: close relation to the packaging sites of avian, murine, and human retroviruses. *J Virol*, 67, 1830–1839.
- Kerkhofs, P., Heremans, H., Burny, A., Kettmann, R., Willens, L., & Willems, L. (1998). In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J Virol*, 72, 2554–2559.
- Kettmann, R., Cleuter, Y., Mammerickx, M., Meunier-Rotival, M., Bernardi, G., Burny, A., & Chantrenne, H. (1980). Genomic integration of bovine leukemia provirus: comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77, 2577–2581.

- Korber, B. (2000). *HIV signature and sequence variation analysis*. (Vol. In: Allen,).
- Lagarias, D. M., & Radke, K. (1989). Transcriptional activation of bovine leukemia virus in blood cells from experimentally infected, asymptomatic sheep with latent infections. *Journal of Virology*, *63*, 2099–2107.
- Lee, Kim EJ, Ratthanophart J, Vitoonpong R, Kim BH, Cho IS, Song JY, Lee KK, S. Y. (2016). Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infect Genet Evol.*, *41*, 245–254.
- Lefèbvre, L., Ciminale, V., Vanderplasschen, A., Agostino, D., Burny, A., Willems, L., & Kettmann, R. (2002). Subcellular Localization of the Bovine Proteins Subcellular Localization of the Bovine Leukemia Virus R3 and G4 Accessory Proteins, *76*, 7843–7854.
- Lefebvre, L., Vanderplasschen, A., Ciminale, V., Heremans, H., Dangoisse, O., Jauniaux, J., ... Willems, L. (2002). Oncoviral bovine leukemia virus G4 and human T-cell leukemia virus type 1 p13 II accessory proteins interact with farnesyl pyrophosphate synthetase. *Journal of Virology*, *76*, 1400–1414.
- Mamoun, R. Z., Morisson, M., Rebeyrotte, N., Busetta, B., Couez, D., Kettmann, R., Guillemain, B. (1990). Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *Journal of Virology*, *64*, 4180–8.
- Martin D, Arjona A, Soto I, Barquero N, Viana M, G.-L. E. (2001). Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 97–106.
- MEAS, S., OHASHI, K., TUM, S., CHHIN, M., TE, K., MIURA, K., ONUMA, M. (2000). Seroprevalence of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Draught Animals in Cambodia. *Journal of Veterinary Medical Science*, *62*, 779–781.
- Meas, S., Usui, T., Ohashi, K., Sugimoto, C., & Onuma, M. (2002). Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Veterinary Microbiology*, *84*(3), 275–282.
- Merimi, M., Klener, P., Szynal, M., Cleuter, Y., Bagnis, C., Kerkhofs, P., ... Van den Broeke, A. (2007). Complete suppression of viral gene expression is associated with the onset and progression of lymphoid malignancy: Observations in Bovine Leukemia Virus-infected sheep. *Retrovirology*, *4*, 1–9.

- Meuten, D. J. (2017). *Tumors in Domestic Animals*. (D. J. Meuten, C. of V. Medicine, N. C. S. University, & U. Raleigh, NC, Eds.) (Fifth Edit).
- Mirsky, M. L., Olmstead, C. a, Da, Y., & Lewin, H. a. (1996). The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *Journal of Virology*, *70*, 2178–2183.
- MIURA, S., HORIUCHI, N., MATSUMOTO, K., KOBAYASHI, Y., KAWAZU, S., & INOKUMA, H. (2015). Detection of monoclonal integration of bovine leukemia virus proviral DNA as a malignant marker in two enzootic bovine leukosis cases with difficult clinical diagnosis. *Journal of Veterinary Medical Science*, *77*, 883–887.
- Monroy, B. . (1987). Estudio seroepizootiológico de la leucosis enzoótica bovina en México. *Tec.Pec. En México*, *25*, 151–154.
- Moratori, G. (2012). *Aspectos Genómicos y Evolutivos del virus de la Leucosis Bovina*. Universidad de la República.Uruguay.
- Nagashima, K., Yoshida, M., & Seiki, M. (1986). A single species of pX mRNA of human T-cell leukemia virus type I encodes trans-activator p40x and two other phosphoproteins. *Journal of Virology*, *60*, 394–9.
- Nakano, Y., Aso, H., Soper, A., Yamada, E., Moriwaki, M., Juarez-Fernandez, G., ... Sato, K. (2017). A conflict of interest: The evolutionary arms race between mammalian APOBEC3 and lentiviral Vif. *Retrovirology*, *14*, 1–12.
- Norby, B., D. P., Grooms, D. L., Swenson, C. L., Zalucha, J., & Erskine, R. J. (2014). Reference Point leukemia virus in dairy cattle, 244.
- OIE. Chapter 2.4.10—Enzootic Bovine Leukosis. OIE Terrestrial Manual 2012:721–732.
- Panei, C. J., Serena, M. S., Metz, G. E., Bravi, M. E., González, E. T., & Echeverría, M. G. (2013). Analysis of the pX region of bovine leukemia virus in different clinical stages of Enzootic Bovine Leukemia in Argentine Holstein cattle. *Virus Research*, *171*, 97–102.
- Pierard, V., Guiguen, A., Colin, L., Wijmeersch, G., Vanhulle, C., Van Driessche, B., ... Van Lint, C. (2010). DNA cytosine methylation in the bovine leukemia virus promoter is associated with latency in a lymphoma-derived B-cell line: Potential involvement of direct inhibition of camp-responsive element (CRE)-binding protein/cre modulator/activation transcription. *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 19434–19449.
- Polat, M., Takeshima, S., & Aida, Y. (2017). Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology Journal*, *14*, 209.

- Polat, M., Takeshima, S., nosuke, Hosomichi, K., Kim, J., Miyasaka, T., Yamada, K., Aida, Y. (2016). A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*, 13, 1–23.
- Powers, M. A., Grossman, D., Kidd, L. C., & Radke, K. (1991). Episodic Occurrence of Antibodies against the Bovine Leukemia Virus Rex Protein during the Course of Infection in Sheep, 65, 4959–4965.
- Pozzatti, R., Vogel, J., & Jay, G. (1990). The human T-lymphotropic virus type I tax gene can cooperate with the ras oncogene to induce neoplastic transformation of cells. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 413–7.
- Rajão, D. S., Heinemann, M. B., Reis, J. K. P., Braz, G. F., Haddad, J. P. A., Ribeiro, A. C. C. L., & Leite, R. C. (2014). Effects of bovine leukemia virus infection on crossbred and purebred dairy cattle productive performance in Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 35, 891.
- Rama, G. (2009). Aspectos sobre el diagnóstico de leucosis enzoótica bovina, 1–34. *Universidad de la República. Uruguay*.
- Ramón Santiago, R. G. (2018). *Descripción morfológica de tumores en bovinos de la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo*. FES UNAM.
- Rodríguez, S. M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M. T., Boxus, M., ... Willems, L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV. *Viruses*, 3, 1210–1248.
- Rodriguez, S. M., Golemba, M. D., Campos, R. H., Trono, K., & Jones, L. R. (2009). Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: Evidence for the existence of two novel clades. *Journal of General Virology*, 90, 2788–2797.
- Sagata, N., Yasunaga, T., Ohishi, K., Tsuzuku-Kawamura, J., Onuma, M., & Ikawa, Y. (1984). Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *The EMBO Journal*, 3, 3231–7.
- Suzuki, S., Konnai, S., Okagawa, T., Ikebuchi, R., Shirai, T., Sunden, Y., ... Ohashi, K. (2013). Expression analysis of Foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle. *Microbiology and Immunology*, 57, 600–604.

- Tajima, S., & Aida, Y. (2000). The Region between Amino Acids 245 and 265 of the Bovine Leukemia Virus (BLV) Tax Protein Restricts Transactivation Not Only via the BLV Enhancer but Also via Other Retrovirus Enhancers. *Journal of Virology*, 74, 10939–10949.
- Trono, K. G., P?rez-Filgueira, D. M., Duffy, S., Borca, M. V., & Carrillo, C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: Comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Veterinary Microbiology*, 83, 235–248.
- Tsutsui, T., Kobayashi, S., Hayama, Y., & Yamamoto, T. (2016). Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 124, 96–101.
- Uruchurtu, A. (1967). Incidencia de lifosarcoma en bovinos D.F. *In Esc. Nal. de Med .Vet.Zoo, Tesis de licenciatura.*(Escuela Nacional de Veterinaria y Zootecnia), UNAM México D.F.
- USDA. (2008). Bovine Leukosis Virus (BLV) on U . S . Dairy Operations ,. *APHIS Info Sheet*, (October), 1–2.
- Willems, L., Gegonne, a, Chen, G., Burny, a, Kettmann, R., & Ghysdael, J. (1987). The bovine leukemia virus p34 is a transactivator protein. *The EMBO Journal*, 6, 3385–3389.
- Willems, L., Heremans, H., Chen, G., Portetelle, D., Billiau, A., Burny, A., & Kettmann, R. (1990). Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation. *Embo J*, 9(5), 1577–1581.
- Willems, L., Kerkhofs, P., Attenelle, L., Burny, A., Portetelle, D., & Kettmann, R. (1997). The major homology region of bovine leukaemia virus p24(gag) is required for virus infectivity in vivo. *Journal of General Virology*, 78, 637–640.
- Wu, M. C., Shanks, R. D., & Lewin, H. A. (1989). Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(3), 993–996.
- Yoshida M. (2001). Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol.*, 19:, 475–96.
- Zapp, M. L., Hope, T. J., Parslow, T. G., & Green, M. R. (1991). Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*, 88, 7734–8.
- Zavaleta J. Respuesta serológica, carga viral y linfocitosis persistente en bovinos infectados por el virus de la Leucosis Enzoótica Bovina (vLEB). 2009

- Zhao, X., Jimenez, C., Sentsui, H., & Buehring, G. C. (2007). Sequence polymorphisms in the long terminal repeat of bovine leukemia virus: Evidence for selection pressures in regulatory sequences. *Virus Research*, 124, 113–124.
- Zhao, X., McGirr, K. M., & Buehring, G. C. (2007). Potential evolutionary influences on overlapping reading frames in the bovine leukemia virus pXBL region. *Genomics*, 89, 502–511.

10. Anexos

Anexo 1

Protocolo de obtención de leucocitos de sangre periférica y plasma.

Método Gorodezky (2009)

1. Centrifugar el tubo de sangre con anticoagulante a 3000 rpm durante 15 minutos para la separación del plasma y células.
2. Transferir con una pipeta Pasteur el plasma a un microtubo y la capa blanca de leucocitos a un tubo Falcon de 14 ml.
3. Agregar 10ml de solución de lisis I al tubo Falcon y homogenizar con Vórtex.
4. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos, desechar cuidadosamente el sobrenadante por decantación.
5. Repetir los pasos 3 y 4 con solución de lisis II.
6. Agregar 7ml de PBS al paquete de células blancas. Si es necesario, se le puede agregar 3 ml de agua bidestilada para lisar los glóbulos rojos restantes.
7. Homogenizar y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
8. Decantar y recuperar con PBS 200 a 300 μ l del botón de células blancas del fondo y colocar en un microtubo estéril. Etiquetar y almacenar a -20°C hasta su uso.

Anexo 2.

Protocolo para la detección de anticuerpos contra el VLB mediante ELISA indirecto (Kit comercial VMRD).

Descripción general.

Este ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISAI) detecta anticuerpos contra la glicoproteína gp51 del virus de leucemia bovina (VLB) en suero bovino. Los anticuerpos en suero se unen a las moléculas gp51 del VLB con las que están sensibilizados los pozos de plástico de la placa. La unión de estos anticuerpos (inmunoglobulinas bovinas) es detectada por la acción en contra de los anticuerpos bovinos con anticuerpos de cabra marcados con peroxidasa (HRP). Las uniones de los anticuerpos marcados con HRP son detectadas por la adición del sustrato de la enzima que se evidencia por el cambio de color azul que

se produce. La cantidad del color azul indica la presencia de anticuerpos contra gp51 del VLB en el suero de la muestra. El desarrollo de un color muy débil o la ausencia indica la ausencia de anticuerpos contra la gp51 del VLB en la muestra de suero.

Preparaciones previas.

1. Atemperado de reactivos: someter las muestras, los reactivos y placas a temperatura ambiente $23 + 2^{\circ}\text{C}$ previo al inicio de la prueba.
2. Preparado de controles y muestra: las muestras de suero deben ser diluidas 1/25 con el buffer de dilución del suero (G). Se recomienda realizar estas diluciones en una placa de transferencia sin sensibilizar o en tubos de ensaye. Se requieren al menos 65 μl de cada muestra diluida por pozo considerando el error del pipeteo. Homogenizar la muestra mediante el pipeteo o vórtex. Los controles positivos y negativo están listos para su uso, por lo tanto, no deben ser diluidos. Cuando se utilice la totalidad de los pozos de la placa, es mejor colocar los controles en los pozos en los extremos distantes (A1 Y H12 respectivamente). Los controles se deben correr en cada placa.
3. Preparado de la placa. Retire las columnas de las placas removibles (A) en caso de no ocupar todos los pozos. Si aplica, devolver las placas sin utilizar a su caja cubiertas con papel auto-adherible. Poner atención en la orientación de la placa.
4. Preparado del conjugado. Preparar el anticuerpo conjugado con peroxidasa 100x (D) en 99 partes del buffer de dilución del conjugado (E). Ejemplo: para 96 pozos mezclar 60 μl del anticuerpo conjugado con peroxidasa 100x (D) con 5.940 ml de buffer de dilución del conjugado (E) para preparar 6ml de conjugado 1X. Se necesitan 50 μl por pozo.
5. Preparado de la solución de lavado. Preparar la solución de lavado 1X diluyendo una parte del concentrado de solución para lavado 10 X (F) en 9 partes de agua desionizada o destilada. Se necesitan aproximadamente 1.5 ml por pozo. Preparar una porción extra considerando posibles pérdidas en el pipeteo.

Procedimiento para la prueba

1. Carga de controles y muestras de suero: usando una pipeta de 50 μl colocar los controles y las muestras dentro de la placa sensibilizada con el antígeno (A). Las muestras de suero y controles deben ser cargados dentro de la placa (A) tan rápido como sea posible. Cuando se corran más de dos columnas desmontables, se recomienda que las muestras de suero y controles sean cargados primero en una placa de transferencia y

después transferirlos a la placa (A) usando una pipeta multicanal. El volumen de muestra en la placa de transferencia debe estar por arriba de los 50 μ l con la finalidad de transferir 50 μ l a la placa (A). Golpear ligeramente con cuidado la placa por los lados varias veces para asegurar que las muestras toquen el fondo de los pozos. Procurar no salpicar las muestras contenidas en los pozos para evitar contaminación. **Incubar la placa 20 minutos a temperatura ambiente 23 + 2°C.**

2. Lavado de pozos: después de la incubación lavar tres veces los pozos de la placa. Para ello vacié el contenido de los pozos en la tarja y remueva los remanentes de muestras y controles golpeando a placa invertida 4 veces sobre una servitoalla, golpeando en un lugar limpio por cada ocasión. Inmediatamente llene cada pozo con solución de lavado 1X usando una pipeta multicanal. Vacíe la solución de lavado y remueva los remanentes golpeando la placa invertida en una servitoalla, golpeando en un lugar limpio cada ocasión. Repita el procedimiento de lavado dos veces más (tres veces en total).

3. Adición del conjugado: agregar 50 μ l del anticuerpo conjugado con peroxidasa diluido a 1X en cada pozo. Golpear ligeramente la placa por los lados varias veces para asegurar que el sustrato alcance el fondo. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

4. Lavado de pozos: después de la incubación, lavar la placa como en el paso 2.

5. Adición del sustrato: añadir 50 μ l del sustrato (H) a cada pozo. Golpear ligeramente los lados de la placa para asegurar que el sustrato alcance el fondo. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar que la placa sea expuesta a la luz del sol. En este paso no se vacían los pozos.

6. Adición de solución de paro: añadir 50 μ l de solución de paro (I) a cada pozo. Golpear los lados de la placa varias veces para asegurar que se mezclen las soluciones de sustrato con la de paro- PELIGRO: en este paso no se vacían los pozos.

7. Lectura y registro de los resultados. Inmediatamente después de añadir la solución de paro, la placa debe ser leída en un espectrofotómetro de absorbancia para placas. Ajustar la Densidad Óptica (D.O) para leer longitudes de onda de 620, 630nm.

Validación de la prueba

El control positivo debe generar una D.O > 0.250 y < 2.000.

El control negativo debe generar una D.O < 2.000.

Interpretación de resultados

Las muestras son positivas para anticuerpos contra el VLB si ellas producen una densidad óptica mayor o igual que la referida D.O del control positivo.

Las muestras de la prueba son negativas a la presencia de anticuerpos contra VLB si ellas producen una densidad óptica menor que la referida por la D.O del control negativo.

Anexo 3.

Protocolo de extracción de ADN genómico (Kit comercial FavorGen®)

Minikit para extracción de ADN genómico de tejidos

Descripción general

Es un kit comercial que ofrece un método rápido y económico para purificar ADN total de muchos tipos de tejido animal. Esta tecnología primero lisa las células y desnaturaliza las proteínas usando sales caotrópicas y proteinasa K, luego se captura el ADN mediante membranas basadas en sílice, se lava con buffer de lavado que contiene etanol y después se eluye con una solución baja en sales o agua bidestilada.

Comparado con otros procesos más complejos y que requieren mayor tiempo para realizarlos, dicho kit acorta el tiempo de procedimiento en menos de una hora (el tiempo de lisis varía dependiendo del tejido procesado). El tamaño del ADN recuperado es por arriba de 50 Kpb. La mayor longitud de ADN mejora la eficiencia durante la reacción de PCR.

Procedimiento de la prueba.

Paso 1

Previamente centrifugado el microtubo con células en suspensión a 4000 rpm por 1 minuto y eliminar el sobrenadante por decantación.

1. Agregar 200 µl de buffer FATG1, se homogeniza la muestra de tejido y se macera con un micropestillo.

Paso 2: Lisis

2. Agregar 20 μl de proteinasa K (10mg/ml) a la muestra obtenida. Mezclar por agitación.
3. Incubar a 60° por 15 minutos, esto con la finalidad de que el tejido se lise completamente.
4. Centrifugar brevemente (spin) el tubo para remover los residuos de la tapa.
5. Agregar 200 μl de buffer FATG2 a la muestra y mezclar a fondo por homogenización e incubar a 70° por 10 minutos.
6. Centrifugar brevemente el tubo para remover las gotas de la tapa; si existe material insoluble presente, centrifugar a máxima velocidad y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

Paso 3. Unión al ADN.

7. Agregar 200 μl de etanol grado biología molecular a la muestra y homogenizar la mezcla.
8. Centrifugar brevemente el tubo para remover las gotas de la tapa.
9. Colocar una minicolumna FATG en un tubo colector, transferir la mezcla de la muestra cuidadosamente a la columna.
10. Centrifugar por un minuto a 14000 rpm y desechar el fluido que paso a través de ella hacia el tubo colector.

Paso 4. Lavado.

11. Lavar la columna FATG con 500 μl de buffer W1, centrifugar por un minuto y desechar el líquido restante. Es importante asegurar que el etanol que fue añadido al buffer W1.
12. Lavar la columna FATG con 750 μl de buffer de lavado y centrifugar por un minuto; desechar el restante y centrifugar la columna adicionalmente durante 3 minutos para secar la misma.

¡Paso importante! Este paso evita que el líquido residual inhiba las reacciones enzimáticas subsecuentes.

Paso 5. Elución del ADN (homogenización).

13. Colocar la columna FATG en un tubo de elución y añadir 30 μl de buffer de elución o agua desionizada (pH 7.5 - 8.5) al centro de la membrana de la columna. Dejar reposar por 3 minutos.

14. Centrifugar por 2 minutos para eluir el ADN total.

Anexo 4.

Protocolo de purificación PCR/ Gel (Kit comercial Favorgen®)

Para la extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

1. Cortar con un bisturí limpio, la fracción de gel que contenga el fragmento de ADN de interés, procurando tomar la mínima cantidad de gel fuera de la muestra.
2. Transferir el gel (no más de 300 mg) a un tubo de microcentrífuga.
3. Añadir 500 µl de buffer FAGP y mezclar con vibro mezclador. Para geles de agarosa < 2% agregar 1000 µl del buffer FAGP.
4. Incubar a 55°C por 5-10 minutos (homogenizar con el vibro mezclador cada 2 – 3 minutos hasta disolver el gel durante la incubación).
5. Enfriar la muestra a temperatura ambiente y colocarla en una columna de FADF dentro de un tubo colector.
6. Transferir 800 µl de la muestra mezclada a la columna FADF. Centrifugar a 13 000 rpm por 30 segundos y desechar el fluido del tubo colector. Si la muestra mezclada rebasa los 800 µl repetir el paso para el resto de la muestra.
7. Añadir 750 µl de buffer de lavado a la columna FADF. Centrifugar por 30 segundos. Desechar el fluido del tubo colector. Asegurar que el etanol (96-100%) haya sido añadido a la solución de lavado.
8. Centrifugar de nuevo a máxima potencia por 3 minutos para secar la columna. Paso importante. El líquido residual debe ser eliminado completamente en este paso.
9. Colocar en la columna FADF un nuevo tubo para microcentrífuga.
10. Añadir 15 µl de buffer de elución en el centro de la membrana de la columna FADF. Esperar un minuto.
11. Centrifugar por un minuto.

Anexo 5. Protocolo para Hibridación *in situ*.

1. Se colocan las laminillas cargadas en la platina de 35 - 40°C durante 30 minutos.
2. Colocar las laminillas en la canastilla para ser desparafinazadas con xilol 1, 2 y 3 durante 5 minutos.

3. Se rehidratan con alcohol al 100% durante 5 minutos, alcohol al 95% durante 2 minutos y alcohol al 70% durante 2 minutos.
4. Las laminillas son colocadas en un holder y se pasan a la solución de automation buffer, durante 1 minuto y se realiza una inmersión.
5. Se coloca la pepsina y se realiza una inmersión.
6. Se coloca nuevamente la pepsina y se incuba a 37°C durante 10 minutos, después a 105°C durante 8 minutos y se realiza una inmersión.
7. Se coloca automation buffer y se realiza una inmersión, esto se realiza 4 veces.
8. Se coloca formamida al 100% y se incuba a 105 °C durante 5 minutos y se realiza una inmersión.
9. Se coloca la solución de hibridación mezclada con la sonda marcada y se incuba a 105°C durante 5 minutos, después a 37°C por una hora.
10. Se realizan los lavados con la solución de citratos a 0.5% y se realiza una inmersión, repetir 5 veces.
11. Se realizan los lavados con la solución de citratos a 0.2% y se realiza una inmersión, repetir 5 veces.
12. Se coloca nuevamente solución de citratos al 0.2% y se incuba a 37°C durante 5 minutos y se realiza una inmersión.
13. Se prepara la solución anti-dig y se incuban a 37°C durante 45 minutos y se realiza una inmersión.
14. Se coloca el holder en el buffer 1 y se realiza una inmersión.
15. Remover las laminillas del holder y se enjuagan en el automation buffer.
16. Se colocan nuevamente las laminillas en el holder y se realiza una inmersión.
17. Se transfieren al buffer 2 y se realiza una inmersión.
18. Se coloca el cromógeno y se deja incubar a 37°C durante 30 a 45 minutos y se realiza una inmersión.
19. Se pasan las laminillas en agua destilada y se realiza una inmersión.
20. Remover las laminillas del holder.
21. Teñir con verde rápido durante 5 minutos y pasarlas al tren de enjuague rápidamente.
22. Dejar secar las laminillas y montar permanentemente las laminillas