

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Producción de la proteína p24 recombinante para la inmunodetección de
Leucosis viral bovina**

Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Médico Veterinario
Zootecnista

Autores:

Franklin Eduardo Aucay Aucay

Erika Alexandra Manrique Quizhpi

Director:

Antonio Javier Vallecillo Maza

ORCID:  0000-0001-9141-0176

Cuenca, Ecuador

2024-10-28

Resumen

La Leucosis viral bovina es una patología crónica principalmente subclínica, cuyas principales lesiones corresponde al desarrollo de neoplasias e inmunosupresión, causadas por la infección del Virus de leucemia bovina (BoLV), éste es un Retrovirus el cual se transmite de manera horizontal, por contacto directo entre animales sanos con fluidos principalmente sangre de animales infectados, de forma mecánica mediante vectores, como insectos hematófagos, por vía iatrogénica y vertical por vía transplacentaria, la cual ocurre en menor porcentaje. Esta enfermedad se ha descrito en el Ecuador, sin embargo, no se cuenta con datos sobre la frecuencia y el impacto económico de la enfermedad en la industria bovina. Una de las limitantes para la aplicación de medidas de control y eliminación de la enfermedad en los hatos afectados se centra en la poca disponibilidad de herramientas diagnóstica que permita la identificación de los animales afectados. La identificación de los animales expuestos al BoLV y potencialmente infectados se basa en la detección de anticuerpos que reconocen antígenos estructurales, por ello el objeto de este trabajo correspondió a producir el antígeno recombinante p24 en un modelo de expresión bacteriano basado en *Escherichia coli* y evaluar su reconocimiento por anticuerpos con el uso de sueros de animales considerados seropositivos al BoLV mediante ensayos de ELISA indirecto. El antígeno p24 se seleccionó por ser una de las proteínas que se encuentra en mayor cantidad en la cápside del retrovirus, mediando el empacado del genoma de ARN, y es considerada como un antígeno útil para el diagnóstico debido a que muestra una fuerte capacidad para inducir respuesta inmune. Como resultado se logró obtener el antígeno recombinante p24 en forma pura en el modelo de expresión bacteriano, obteniendo un rendimiento estimado de 4,87 mg/l, y el cual fue reconocido por los anticuerpos presentes en muestras de suero de bovinos seropositivos.

Palabras clave del autor: veterinaria, enfermedad animal, virus, biotecnología, inmunología, diagnóstico



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Bovine leukosis is a chronic pathology with limited clinical manifestation, whose main lesions correspond to the development of neoplasias and immunosuppression, caused by the infection of the Bovine leukemia virus (BoLV), this is a Retrovirus which is transmitted horizontally, by direct contact between healthy animals with fluids from infected animals, mechanically through vectors, such as hematophagous insects, iatrogenically and vertically through the transplacental route, which occurs in a lower percentage. This disease has been described in Ecuador, however there is no data on the frequency and economic impact of the disease in the bovine industry. One of the limitations for the application of disease control and elimination measures in affected herds focuses on the limited availability of diagnostic tools that allow the identification of affected animals. The identification of animals exposed to BoLV and potentially infected is based on the detection of antibodies that recognize structural antigens, therefore the objective of this work was to produce the recombinant antigen p24 in a bacterial expression model based on Escherichia coli and evaluate its recognition by antibodies with the use of sera from animals considered seropositive to BoLV using indirect ELISA assays. The p24 antigen was selected because it is one of the proteins found in greatest quantity in the retrovirus capsid, mediating the packaging of the RNA genome, and is considered a useful antigen for diagnosis because it shows a strong capacity to induce immune response. As a result, it was possible to obtain the recombinant p24 antigen in pure form in the bacterial expression model, obtaining an estimated yield of 4,87 mg/l, and which was recognized by the antibodies present in serum samples from seropositive bovines.

Author Keywords: veterinary, animal disease, viruses, biotechnology, immunology, diagnostic



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

	Contenido:	Página:
	Resumen y palabras clave	2
	Abstract and keywords	3
	Índice de contenido	4
	Índice de figuras	6
	Índice de tablas	7
	Agradecimientos	8
	Dedicatorias	10
	Listado de abreviaturas	12
1.	Introducción	13
2.	Objetivos y pregunta de investigación.....	15
3.	Pregunta de investigación	15
4.	Revisión bibliográfica	16
4.1.	Virus de la leucosis viral bovina	16
4.1.1.	Reseña histórica	16
4.1.2.	Estructura de la partícula viral	16
4.1.3.	Proteína 24	18
4.1.4.	Transmisión de la infección	18
4.1.5.	Carga Pro viral	19
4.1.6.	Control y Erradicación de la LVB	19
4.2.	Prevalencia e impacto económico del BLV	20
4.2.1.	Longevidad de las vacas con BLV	21
4.2.2.	LVB y la salud humana	22
4.2.2.1	Cáncer de mama y el BoLV	22
4.2.3	Herramientas para la reducción del impacto de la LVB	23
4.2.4.	Inmunógenos para la profilaxis de la LVB	23
4.2.5	Métodos diagnósticos	23
4.2.5.1.	Método de diagnóstico directo	24
4.2.5.1.1.	PCR	24
4.2.5.2.	Métodos de diagnóstico indirecto	24
4.2.5.2.1.	ELISA indirecto	24
5.	Materiales y métodos	25
5.1.	Diseño de primers y construcciones genéticas	25
5.1.1.	Materiales	25
5.1.2.	Procedimiento	25
5.2.	Obtención de material genético total de muestras de sangre total de un bovino seropositivo al BoLV	25
5.2.1.	Materiales	25
5.2.2.	Procedimiento	26
5.3.	Amplificación de secuencias codificante del antígeno p24 del BoLV mediante PCR	27
5.3.1.	Materiales	27
5.3.2.	Procedimiento	28
5.4.	Clonación de la secuencia codificante del antígeno p24 y construcción del plásmido de expresión pET15b-p24BovLV	29

5.4.1.	Materiales	29
5.4.2.	Procedimiento	31
5.5.	Generación de la cepa de expresión recombinante <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) con el plásmido pET15b-p24BoLV	33
5.5.1.	Materiales	33
5.5.2.	Procedimiento	35
5.6.	Purificación IMAC del antígeno recombinante p24	37
5.6.1.	Materiales	37
5.6.2.	Procedimiento	38
5.7.	Diálisis, cuantificado y almacenado de las fracciones proteicas con el antígeno p24	39
5.7.1.	Materiales	39
5.7.2.	Procedimiento	40
5.8.	Evaluación del reconocimiento del antígeno recombinante p24 por anticuerpos bovinos	41
5.8.1.	Materiales	41
5.8.2.	Procedimiento	42
5.9.	Análisis estadístico del reconocimiento de las dos fracciones proteicas con el antígeno recombinante p24 por anticuerpos bovinos	43
5.9.1.	Materiales	43
5.9.2.	Procedimiento	43
6.	Resultados	44
7.	Discusión	49
8.	Conclusión	50
9.	Recomendaciones	51
10.	Bibliografía	52
11.	Anexos	57

Índice de figuras

Contenido:	Página:
Figura 1: Esquema de la organización y la estructura de la partícula viral del BoLV.	17
Figura 2: A: Amplificación, B: Clonación pGEMT, Reamplificación, C: Clonación pET15b	44
Figura 3: Fracciones de 4 colonias seleccionadas de la cepa Rosetta 2 (DE3): pET15b-p24BovLV	45
Figura 4: IMAC	46
Figura 5: Cuantificación:	47
Figura 6: Gráfico T student con muestras pareadas.	48

Índice de tablas

	Contenido:	Página:
Tabla 1.	Composición de la mezcla de reacción para los ensayos de PCR para la amplificación de la secuencia codificante de p24.	28
Tabla 2.	Perfil de temperaturas de amplificación de la secuencia codificante del antígeno p24.	29
Tabla 3.	Mezcla de reactivos para el gel separador.	36
Tabla 4.	Mezcla de reactivos para el gel concentrador.	37

Agradecimientos

Franklin Eduardo Aucay Aucay

Sin lugar a duda quiero dejar constancia de mis más sinceros agradecimientos a mi madre, María Esther Aucay González a mi padre, Ariolfo Aucay, a mis hermanos, a mi tío, Ramiro Aucay, mis amigos Moisés Merchán, Byron Arias, Juan Sigua, Carmen Salmerón, y de manera especial a mi amiga y compañera de tesis Erika Manrique, a todos ellos que han sido clave en esta etapa.

Mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Antonio J. Vallecillo, por su paciencia, carisma, dedicación, por su excelente don de gente como mentor tanto en lo intelectual como en lo profesional. Así mismo, mi enorme gratitud con los revisores de tesis la Dra. Silvana Méndez, Dr. Manuel Soria, Dr. Jaime Maldonado y a todo el personal académico que de una u otra manera me han alentado para que hoy a un paso de lograr una meta más, haya sido posible.

Agradecimientos

Erika Alexandra Manrique Quizhpi

Agradezco infinitamente a todas las personas que formaron parte de esta etapa maravillosa y que colaboraron para que este proyecto se haga realidad.

Gracias a mi madre Lorena Quizhpi por creer en mí, apoyarme y acompañarme en este largo viaje educativo, por abrazarme cuando más lo necesitaba, no ha sido el camino fácil, pero con su amor, consejos y comprensión lo complicado de este trayecto se ha notado menos.

Mi corazón se llena de gratitud a mi padre Franklin Manrique que está en el cielo, su apoyo desde un inicio y consejos cuando pensaba en no seguir adelante queda eternamente en mi corazón, gracias a él por apoyarme, sin él no hubiera sido posible.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mi compañero y amigo de investigación Eduardo Aucay por su colaboración a lo largo del proyecto. La amistad que se formó a lo largo de la carrera es algo muy importante, espero que la vida sea generosa y llena de éxitos para ti.

Un agradecimiento especial a mi tutor de tesis Dr. PhD Antonio Vallecillo por habernos brindado su ayuda, contribuyendo con sus conocimientos, experiencias y paciencia que fueron parte esencial a lo largo de este proyecto de investigación.

Mi reconocimiento al personal de la biblioteca, cuya ayuda fue indispensable. Su amabilidad contribuyó enormemente a hacer realidad esta investigación.

A cada uno de ustedes mi más profundo agradecimiento que constituyen la base de esta vida profesional.

Dedicatorias

Franklin Eduardo Aucay Aucay

Este trabajo quiero dedicar a la persona que día tras día ha estado alentándome y creyendo en mí, siendo mi apoyo incondicional, mi motor y la razón más importante de vivir, mi motivación para levantarme cada mañana a pesar las duras circunstancias que me han acompañado a lo largo de la carrera, gracias infinitas a mi madre, María Esther Aucay González.

De la misma manera quiero dedicar a mis dos hermanos Armando Deleg y Carmela Aucay por haber sido dos personas que me han dado su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

Finalmente quiero dedicar este trabajo a ese niño que un día salió de su pueblo con el firme propósito de estudiar y demostrarse a sí mismo que a pesar de las adversidades, de los “no lo vas a lograr” finalmente se va cristalizando ese sueño.

Dedicatorias

Erika Alexandra Manrique Quizhpi

El presente proyecto de investigación dedico primeramente a Dios por haber permitido concluir con mi carrera.

Con todo mi corazón y amor dedico a mi adorada madre Lorena Quizhpi, sin ella no hubiera tenido las fuerzas para seguir luchando y haber logrado culminar mi tesis.

A mi padre Franklin Manrique que me apoyo desde el principio de la carrera y no me dejo flaquear cuando pensaba abandonar mis estudios, a pesar que no está presente físicamente, su espíritu y amor siempre me acompaña.

A mi hermanita Cristina que es la luz de mis ojos, su inocencia y carisma alegra mi corazón todos los días de mi vida.

Listado de abreviaturas

Abreviatura:	Significado:
ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
UV	Luz ultravioleta
ORF	(Open Reading frame) Marco abierto de lectura
ADN	Ácido desoxirribonucleico
bp	(Base pair) Pares de bases
s	Segundo
min	Minuto
°C	Grados Celsius
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Reacción en cadena de la polimerasa
IMAC	(Immobilized Metal Affinity Chromatography) Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados
SDS-PAGE	(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
r.p.m.	Revoluciones por minuto
LVB	Leucosis viral bovina
p24	Proteína p24
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
ELISA	(Enzyme Linked Immunoassay) Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
LB	Luria-Bertani
μl	Microlitros
nt's	Nucleótidos

1. Introducción

La producción y consumo de leche y carne ha incrementado en los últimos años, en la misma medida de la demanda generada por el aumento de la población humana, y con el fin de satisfacer las necesidades de la misma, se han hecho mejoras genéticas para tener una producción más eficiente, sin embargo, estas mejoras a pesar de influir positivamente en la producción también traen consigo aspectos negativos; si bien es cierto, se favorecen algunos aspectos de interés, también es bien sabido que varias enfermedades pueden aparecer al incrementarse la selección animal, la consanguinidad, al intentar fijar caracteres fenotípicos de interés, que finalmente conllevan a tener mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas, las cuales en algunos casos causan una baja en la producción láctea, afectando al sistema reproductivo y al llevar a una reducción de la vida productiva de las vacas. Dentro de las principales enfermedades infecciosas virales que afectan al ganado lechero se encuentran la Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), Diarrea viral bovina (DVB), y Leucosis viral bovina (LVB) (SENASA, 2017).

Adicionalmente, alguna de estas enfermedades se sospecha pueden significar un riesgo en salud pública; por ejemplo, investigaciones sugieren que el consumo de leche y sus derivados proveniente de animales seropositivos a LVB, que no tienen un debido proceso de pasteurización antes de la elaboración de los productos tiene relación con la presencia de cáncer de mama en la población humana. Lo anterior se sustenta en que se ha encontrado evidencia de genético viral en muestras de tejidos mamarios con neoplasias, pudiendo llegar a convertirse en un potencial problema zoonótico afectando a la salud pública (Kuczewski *et al.*, 2021).

Por otro lado, el impacto económico en la ganadería bovina causado por la LVB se centra en algunas problemáticas, dentro de las cuales se encuentran pérdidas por alrededor del 5 % a consecuencia del decomiso de canales por la presencia de tumores linfomatosos, en animales sacrificados en Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) (Gutiérrez *et al.*, 2014). La LVB causa inmunosupresión en los animales que lo padecen, razón por la cual los animales infectados son más susceptibles a enfermedades oportunistas, principalmente enfermedades infecciosas como dermatomicosis, mastitis, patologías en las pezuñas y las mucosas (Barlett *et al.*, 2020).

Si bien en Ecuador el ente regulatorio nacional de sanidad animal, la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario-AGROCALIDAD considera a la LVB una enfermedad de declaración obligatoria no cuenta con registros epidemiológicos actualizados de la enfermedad (AGROCALIDAD, 2022). Ante esta realidad en la que se carecen de datos estadísticos en el país sobre la LVB, se desconoce qué porcentaje de la población bovina se encuentra expuesta y potencialmente infectada, desconociendo las pérdidas

económicas al sector agropecuario. Dentro de los pocos datos con los que se cuenta; en el 2017 se reportó un estudio de seroprevalencia con 3.307 muestras bovinas a las que se les aplicó un *test* con una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 98 y 100%, respectivamente, encontrando como resultado en la provincia de Manabí un 0,89, en Chimborazo 3,13 y en Pichincha 8,13% de muestras positivas a la presencia de anticuerpos (Vásconez-Hernández *et al.*, 2017). Entre los años 2020 - 2022 se realizó un estudio en las provincias de Azuay y Cañar en la cual se reportó un porcentaje de positividad entre 21 – 41% (Maldonado & Pérez, 2022).

Por lo anterior, se hace necesario una mayor evaluación de la LVB lo cual requiere una disponibilidad de pruebas diagnósticas de esta infección viral. Sin embargo, es importante señalar que en el país no se han desarrollado los insumos necesarios para la elaboración de *kits* inmunodiagnósticos que faciliten la generación de datos sobre la presencia y frecuencia de la LVB en el Ecuador, es por ello que se ha identificado la necesidad de elaborar un antígeno recombinante con el uso de un modelo bacteriano de expresión, a fin de evaluar a futuro su utilidad en la detección de anticuerpos en animales expuestos y potencialmente infectados con este patógeno viral.

2. Objetivos y pregunta de investigación

2.1. Objetivo general

Producir el antígeno recombinante p24 del Virus de la leucemia bovina en un modelo de expresión bacteriano basado en *Escherichia coli*.

2.2. Objetivos específicos

Generar la construcción genética para la expresión de la proteína p24 del Virus de la leucemia bovina en *Escherichia coli*.

Obtener en forma pura la proteína p24 mediante el empleo del sistema de purificación por afinidad a metales inmovilizados.

Evaluar el reconocimiento del antígeno p24 por anticuerpos de sueros bovinos mediante un ensayo de ELISA indirecto.

3. Pregunta de investigación

¿Es factible obtener en un modelo de expresión bacteriano la proteína recombinante p24 del Virus de leucemia bovina, para la detección de anticuerpos inducidos por la infección viral?

4. Revisión bibliográfica

4.1. Virus de la leucosis viral bovina

4.1.1. Reseña histórica

La Leucosis viral bovina (LVB) es una patología causada por el Virus de la leucemia bovina (BLV), recientemente denominado como *Deltaretrovirus bovineu* (Walker *et al.*, 2022); los primeros datos que se tienen registrados sobre esta enfermedad son parte de las observaciones realizadas en el año de 1871 por Leisering en un bovino, en donde se encontró la presencia de esplenomegalia, nódulos de diferentes tamaños con superficie lisa de color amarillo y una leucocitosis persistente, sin embargo, en esa época no se tenía claro la causa del porqué de estos signos (Manet *et al.*, 1989). Con el pasar de los años se realizaron más notificaciones de LVB en países como Suiza, Estados Unidos de Norteamérica (EEUU), Suecia, Francia, Japón, en el Reino Unido y también en ciertas regiones de Latinoamérica (Burny *et al.*, 1985). En el año de 1969 en Alemania, Miller y colaboradores iniciaron una investigación de esta patología y sobre cuál sería su agente etiológico, lograron observar por microscopia electrónica a partir de linfocitos ya infectados la presencia de estructuras que fueron similares a agentes de tipo viral, sin embargo, no fue hasta el año de 1972 que se pudo relacionar la presencia de virus con la causa del desarrollo de esta patología (Burny *et al.*, 1978; Gillet *et al.*, 2007).

4.1.2. Estructura de la partícula viral

El virus de la LVB pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Orthoretroviridae, del género Deltaretrovirus, es un retrovirus tipo C con una distribución mundial (De Giuseppe *et al.*, 2004). El virión corresponde a una partícula con envoltura y un tamaño entre 80 a 125 nm de diámetro, se presenta en forma esférica o de bastón. Su genoma viral está formada por una molécula de ARN que abarca 8.714 nucleótidos (nt's) (Zhao & Buehring, 2007). Para que el material genético sea empacado con proteínas virales lleva un proceso complejo la cual consiste en la unión de regiones específicas de ARN genómico para una proteína llamada pX, adicionalmente la misma región codifica más proteínas que tienen la función de regular, las cuales son Tax y Rex que son productos de ARN mensajeros generados por empalmado o *splicing* alternativo. El gen pX consta de 3.304 nt's, codifica para las proteínas Rex y Tax, esta última tiene una función regulatoria, activando la transcripción, favoreciendo así la expresión viral e interactuando con otros factores de transcripción y traducción de genes celulares (Boris-Lawrie *et al.*, 1997; Gillet *et al.*, 2007; Rola-Luszczak *et al.*, 2013).

El genoma se encuentra organizado en dos LTR (Long Terminal Regions) localizadas en los extremos 5' y 3' del genoma viral, incluye regiones internas con genes estructurales llamados Gag (*Group-associates antigen*), Pol (*Polymerase*) y Env (*Envelope*) ubicadas en los extremos 5' y 3'. El gen *gag* tiene un tamaño de 1.183 nt's, codifica tres proteínas no glicosiladas, la proteína de la Nucleocápside (p12) que se une al ARN viral, la proteína de la Matriz (p15) la cual se une también al ARN viral e interactúa con las moléculas lipídicas de la envoltura viral y la proteína de la Cápside (p24) que protege al genoma (Llames *et al.*, 2001); este último péptido ha sido utilizado con frecuencia en los laboratorios para determinar la presencia de anticuerpos generados contra el BLV (Ver **Figura 1**).

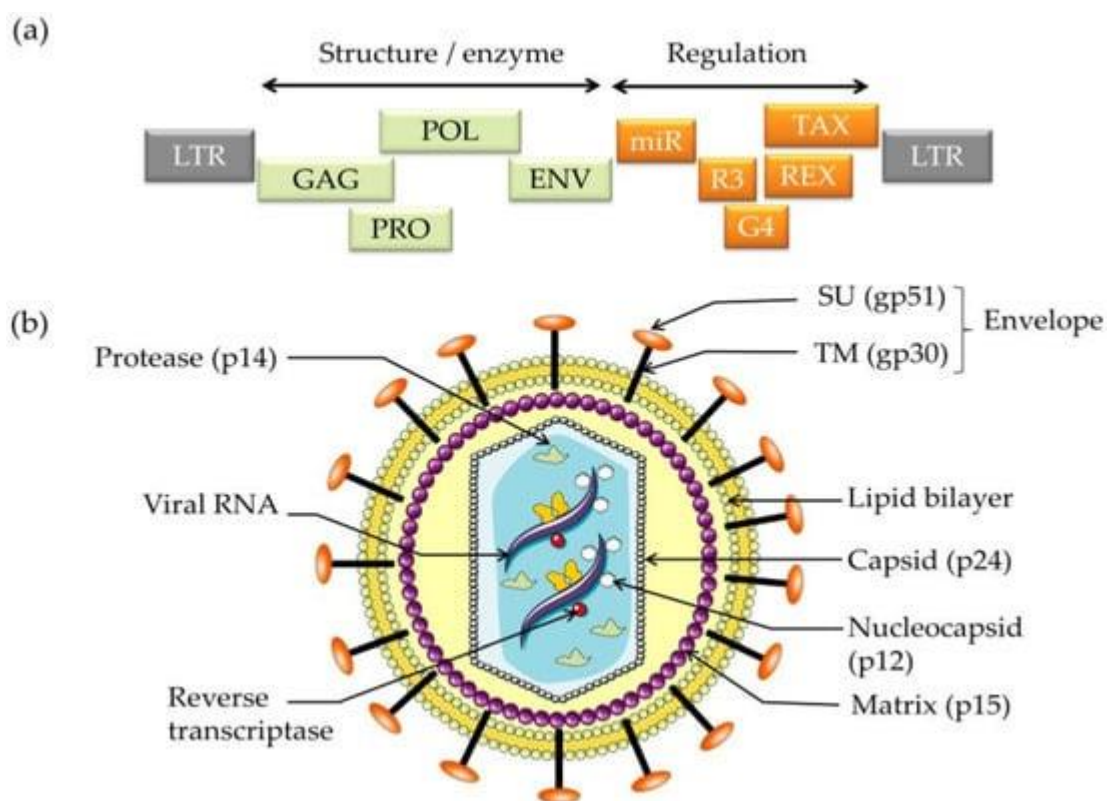


Figura 1: Esquema de la organización y la estructura de la partícula viral del BoLV. **a)** Genoma del virus de la leucemia bovina (LVB), **b)** La partícula viral (Marawan *et al.*, 2021).

El gen *pol* codifica la Transcriptasa reversa y media la integración del ADN proviral del BoLV en el genoma de la célula hospedera. El gen *pro* corresponde a la secuencia codificante de la proteasa p14, la cual se encarga del procesamiento de las poliproteínas precursoras y participa en la maduración postraducciona del virión (Lairmore, 2014). El gen *env* consta de 1,547 nt's, codifica las proteínas de la envoltura, que está compuesto por la glicoproteína 51 que es de la porción extra celular (gp51 o SU) y la glicoproteína 30 que es la porción de

transmembranal (gp30, TM) (Johnston *et al.*, 2002). La estructura interna del virión que empaqueta el ARN genómico está formada por las proteínas de la cápside p12, p15 y p24, siendo p24 la más predominante. En cuanto a la envoltura, en esta se integran las glicoproteínas gp30 y gp51, donde la glicoproteína gp51 es la que despliega un dominio sobre la superficie (Barez *et al.*, 2015).

4.1.3. Proteína 24

La proteína p24 es la proteína principal de la cápside viral, funciona empaquetando el ARN. Es un inmunógeno de alta potencia ya que tiene una gran capacidad de generar respuesta inmune la cual ayuda a detectar a animales infectados por medio de pruebas serológicas (Santillana-Amado & Fernandez-Fernandez, 2018).

4.1.4. Transmisión de la infección

El medio principal por el cual se da la transmisión de la LVB es a través de componentes del sistema sanguíneo, específicamente los linfocitos B que tienen integrado el ADN proviral. Adicionalmente, otras secreciones corporales que elimina el animal son medios importantes para la transmisión del agente causal de esta enfermedad (Monge-Rojas & Elizondo-Salazar, 2019).

Por esta razón la transmisión de este virus se puede dar de distintas formas:

- **Transmisión horizontal:** También llamada directa; ésta ocurre cuando hay exposición de animales sanos a fluidos infecciosos de animales infectados, sin embargo una de las formas más frecuentes en las que ocurre esta transmisión es por malas prácticas de manejo y sanitarias que hacen las personas en las ganaderías, durante actividades tales como el uso agujas hipodérmicas en varios animales, instrumentos quirúrgicos que son utilizados en muchos animales sin una previa limpieza y desinfección siendo que estos instrumentos ya están contaminados con fluidos infectados (Gutiérrez, 2010; Benavides & Laverde-Trujillo, 2012).

- **Transmisión mecánica por vectores:** Ocurre a través de la picadura de insectos hematófagos como “la mosca brava de los establos” (*Stomoxys calcitrans*) y los tábanos (*Diptera Tabanidae*), al atacar estos insectos a varios animales pueden movilizar viriones del BLV o células infectadas (Perino *et al.*, 1990; Consuelo, 2003).

- **Transmisión vertical:** Se considera que el riesgo de transmisión de la LVB por vía vertical (Vía intrauterina, por el calostro y la leche) es relativamente bajo (Consuelo, 2003). La transmisión prenatal ocurre cuando la madre transmite al feto de forma transplacentaria, aunque suele suceder en un menor porcentaje, también la transmisión ocurre en el momento en que la cría consume calostro de una madre infectada, permitiendo que el BLV

logre infectar a los linfocitos B de las placas de Peyer del recién nacido dando paso a su diseminación. Ya que el desarrollo de la enfermedad causada por la infección del BLV es de un progreso lento, las neoplasias o invasiones a órganos vitales puede pasar desapercibida por largo tiempo en el animal infectado (Consuelo, 2003). Es importante recalcar que la probabilidad de transmisión a través del semen de toros es muy baja, sin embargo, se debe evaluar a los toros reproductores que serán utilizados para la monta o para inseminación artificial (Erskine *et al.*, 2012).

4.1.5. Carga proviral

Se denomina carga proviral al número de copias de provirus detectadas en sangre periférica mediante la cuantificación de ADN genómico del BoLV e indirectamente con la titulación de anticuerpos generados en contra de los antígenos gp51 o p24 (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Según Bartlett y colaboradores, el número de copias del provirus circulantes en el animal infectado esta correlacionado con el título de anticuerpos contra la proteína principal del núcleo p24 y con la glicoproteína gp51, por lo tanto, los animales con una carga viral alta van a ser los más potenciales a transmitir el virus. En este estudio establecieron que los animales con una carga viral mayor a 100 copias son altamente transmisibles del BoLV y con una carga menor a 100 copias muestran un menor potencial de transmisión (Bartlett *et al.*, 2020).

Para controlar la diseminación de la enfermedad el método más eficiente consiste en la eliminación de la totalidad de los animales infectados, sin embargo, este método no es económicamente viable en hatos lecheros, por ello, como una herramienta alterna puede emplearse la realización de un recuento de la carga proviral en cada uno de los animales del hato y así determinar cuáles presentan una linfocitosis persistente, tomando en consideración que estos son definidos como los animales transmisores más eficientes debido a que cuentan con un alto porcentaje de linfocitos infectados en circulación periférica y otros fluidos corporales. El desarrollo de linfocitosis persistente va a depender de dos factores como la genética del bovino y las condiciones ambientales donde reside, y en consecuencia de estas dos variables el incremento de la carga proviral que tiene el animal (Juliarena *et al.*, 2007).

4.1.6. Control y erradicación de la LVB

La manera en la que se puede controlar e intentar erradicar la LVB en los hatos afectados consiste principalmente en la identificación de los animales afectados a través de diagnósticos, para continuar con la eliminación de animales. Una vez que el hato sea considerado libre de LVB, se debe hacer un seguimiento serológico anual con el objetivo de mantener el *status* en el hato.

Para el control de la LVB es de gran importancia establecer medidas estrictas de buenas prácticas sanitarias y de manejo; se han tenido buenos resultados en los hatos que aplican una serie de medidas de bioseguridad, entre las que se destacan por su impacto en la reducción de la transmisión se mencionan las siguientes (Dolz *et al.*, 2015; Lv *et al.*, 2024):

- Cuando se hagan extracciones de sangre o se vaya a hacer inyecciones de fármacos o inmunógenos, se debe usar una jeringa y aguja por animal.
- En casos de palpaciones usar guantes obstétricos nuevos en cada animal.
- Lavar, esterilizar o desinfectar instrumentos quirúrgicos usados en el hato y entre cada animal.
- Implementar actividades de control de insectos hematófagos, moscas y tábanos.
- El calostro o la leche empleada para alimentar a los terneros debe proceder de vacas que estén sanas, o en lugar de ellos utilizar sustitutos de leche.
- En caso de utilizar leche de vacas infectadas tratar mediante congelación o someter a tratamiento con calor antes de ser suministrada a los terneros.
- Realizar cotidianamente evaluación sanitaria de los toros que son usados para monta natural, al igual que en caso de emplear inseminación artificial, verificar que el semen proceda de animales no infectados.
- Cuando se adquiera animales, tenerlos en cuarentena con el posterior diagnóstico serológico antes de permitir que convivan con los animales del hato (Monge-Rojas & Elizondo-Salazar, 2019; Lv *et al.*, 2024).

4.2. Prevalencia e impacto económico de la LVB

La prevalencia de la LVB se ha incrementado en países fuera de Europa según se reporta en estudios epidemiológicos; el incremento mayor se ha evidenciado en ganado de leche en contraste con lo observado en el ganado de carne. En algunos países como EEUU, Argentina, Canadá, China y Japón la LVB se ha incrementado considerablemente en los últimos años, llegando a encontrarse en algunos hatos más de la mitad del ganado infectado por el BoLV. En respuesta al incremento de la prevalencia de la LVB, los países más afectados han comenzado a tomar las medidas necesarias para controlar la transmisión del BoLV, para ello se han creado protocolos de bioseguridad, en los cuales incluyen restricciones comerciales estrictas para proteger a sus hatos. En base a una encuesta realizada por el United States Department of Agriculture, los hatos ganaderos en EEUU tienen infectados en un 39 y 83 % de las vacas y los terneros, respectivamente; con una prevalencia general del ganado infectado entre el 23 y 46 % (Gutiérrez *et al.*, 2020).

Uno de los principales hallazgos *post mortem* en los animales afectados por LVB es el linfosarcoma maligno, encontrado en los camales y el cual representa el 26,9 % de

decomiso de las canales en las plantas de faenamiento, mientras que en los hatos ganaderos los animales sacrificados seropositivos para LVB representa el 13,5 %. En Estados Unidos para los productores las pérdidas económicas por año causadas por la LVB se han estimado en \$ 285 millones (White & Moore, 2009).

Las pérdidas económicas pueden variar dependiendo del fin de la explotación, según estudios realizados en hatos lecheros de EEUU. los tumores linfomatosos eran el único elemento de impacto económico conocido relacionado con la LVB, así mismo, determinan que en un porcentaje mayor al 5 % de casos de linfomas están relacionados con animales con el LVB, siendo la principal causa de decomiso de las canales (Sandoval *et al.*, 2015). Al igual que el Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en las personas infectadas, el BoLV tiene la capacidad de debilitar el sistema inmune, permitiendo que patógenos oportunistas causen problemas de salud en los animales infectados, junto con pérdida de peso y reducción de la producción lechera. Entre las enfermedades que más se han relacionado con la LVB, están la mastitis, enfermedades de las pezuñas y de las mucosas. El ganado lechero tiene una baja considerable en la producción lechera y se reduce la vida útil de la vaca. Algunos investigadores coinciden en que por cada 10 % del aumento en la prevalencia de LVB en los hatos ganaderos se observa una disminución de 115 kg de peso en los animales seropositivos (Bartlett *et al.*, 2013).

4.2.1. Longevidad de las vacas con LVB

En un estudio realizado en EEUU encontró que el ganado lechero longevo seropositivo al BoLV, tiene mayor disminución de la producción, además se incrementa en un 23 % la probabilidad de ser sacrificado, mientras en una investigación realizada en Ontario, Canadá reporta que el descarte de ganado seropositivo fue un 27 % mayor al ganado seronegativo (Jacobs *et al.*, 1995). Según una investigación realizada por el United States Department of Agriculture (USDA) en 1996 y otra realizada en Michigan coinciden en que las pérdidas en la producción son alrededor de 95 kg de leche/vaca/año, con un aumento del 10 % de la prevalencia (Bartlett *et al.*, 2013).

La producción de leche también se ve afectada en animales infectados con LVB, en vacas jóvenes la producción es menor en comparación con las vacas más viejas, es decir, las vacas viejas que a pesar de portar el virus y sus sistemas inmunológicos no han sido afectados tienden a tener una mayor producción, sin embargo, estos animales tienen mayor riesgo de contraer enfermedades oportunistas cuando su sistema inmunológico se debilita. (Benitez *et al.*, 2022). Según Bartlett y colaboradores, las vacas positivas a LVB tienden a producir igual o más que las vacas negativas para LVB mientras que su sistema inmunológico no se encuentre afectado. Por otro lado, las vacas longevas infectadas con el

virus y que su sistema inmunológico se ha debilitado resultan en el sacrificio de las vacas antes de terminar su periodo de vida productiva, sin embargo, esto no sucede con las vacas jóvenes ya que su sistema inmunitario es más fuerte. De esta manera los hatos ganaderos con una alta prevalencia de LVB tienden estar constituidos por vacas de mediana edad a jóvenes (Bartlett *et al.*, 2014).

Por otro lado, Da y colaboradores identificaron que los animales infectados con el BoLV y linfocitosis persistente no son capaces de mostrar el potencial genético de producción que poseen, y adicionalmente una disminución en el contenido de grasa en la leche que producen (Da *et al.*, 1993).

4.2.2. LVB y salud humana

La potencial implicación de la LVB como zoonosis ha sido estudiada y debatida por varios años, sin embargo, hasta la fecha no se han presentado estudios que fundamente la relación causal del BoLV con alguna patología en humanos. Sin embargo, se ha informado que en algunas poblaciones humanas aproximadamente del 70 % de las personas poseen anticuerpos anti-BoLV y hasta un 25 % presenta provirus circulando en sangre (Nikbakht *et al.*, 2010). En 1970 se realizaron investigaciones para determinar si personas que han trabajado con animales afectados por LVB, entre los cuales estaban médicos veterinarios, granjeros, trabajadores, inspectores de carne, entre otros se habían infectado con el BoLV o habían presentado alguna patología, a pesar de ello hasta la fecha ningún investigador ha demostrado una relación de causalidad entre la exposición y el contagio con LVB. (Burridge, 1981).

4.2.2.1. Cáncer de mama y el BoLV

Según Gao y colaboradores, el 16 % de las enfermedades de tipo neoplásico tienen como factor involucrado en su desarrollo una infección de tipo viral. Varias investigaciones han evidenciado que hay relación entre el cáncer de mama y LVB, mismas que han demostrado que existe una mayor prevalencia de la presencia de material genético del BoLV en muestras de tejidos mamarios con neoplasias cuando se trata de pacientes expuestos a la LVB. Por ejemplo, se ha reportado una mayor prevalencia de cáncer de mama en lugares como Brasil, en donde la presencia de la LVB es alta, esto se relaciona con el consumo de productos lácteos de origen bovino sin previa pasteurización, no así, en lugares en donde se han erradicado esta enfermedad como los países de la Unión Europea (Kuczewski *et al.*, 2021).

Adicionalmente, Baltzell y colaboradores mencionan que hay una relación altamente significativa entre la presencia de material genético del BoLV y el cáncer de mama en un

grupo de mujeres del estado de Texas, EEUU. En este trabajo se determinó una coincidencia del 51,82% de material genético del BoLV en las neoplasias, indicando que la LVB podría tener una asociación con al menos la mitad de casos de cáncer de mama en esta población estudiada, tomando como principio que este cáncer es un proceso gradual que sufren las células hasta convertirse en cancerígenas y que en esta medida la infección persistente por el BoLV en mujeres podría ayudar a la progresión de la transición de células sanas a células neoplásicas (Baltzell *et al.*, 2018).

4.2.3. Herramientas para la reducción del impacto de la LVB

Dentro de las primeras medidas que se han tomado para la reducción de los efectos negativos de la LVB, se encuentra el sacrificio de los animales con recuentos elevados de carga viral en sangre, más recientemente se ha evaluado la aplicación de la identificación de la respuesta de anticuerpos contra el LVB para proceder con el sacrificio de los animales, sin embargo, tomando en cuenta que hay un alto porcentaje de seropositivos en los diferentes hatos ganaderos es poco aplicable esta medida. A pesar de que se han tomado medidas para evitar más contagios mediante el manejo sanitario, en la actualidad aún se siguen buscando métodos alternativos de control de la LVB, como la aplicación de inmunógenos, la identificación y selección genética de animales más resistente a la LVB (Esteban *et al.*, 2009). En este mismo sentido, Abdalla y colaboradores, en un estudio realizado a vacas Holstein y Jersey determinaron que la heredabilidad de la resistencia a la LVB fue del 8 %, indicando que el factor genético puede contribuir a el nivel de afectación del sistema inmunitario del animal infectado por el BoLV (Abdalla *et al.*, 2013).

4.2.4. Inmunógenos para la profilaxis de la LVB

Según Gutiérrez y colaboradores una de las estrategias para combatir la LVB en países con alta prevalencia es la vacunación, sin embargo, muchos intentos previos para obtener esta vacuna han sido infructuosos, debido a las tasas de evolución que poseen los Retrovirus. Hasta la fecha el modelo de inmunógeno considerado de mayor viabilidad consiste en el uso de un clon atenuado pero competente para la replicación (Gutiérrez *et al.*, 2014).

A diferencia de otros Retrovirus que muestran tasas de altas evolución, el LVB tiene un genoma relativamente estable lo que permite pensar en obtener una vacuna eficaz (Juliarena *et al.*, 2013). En la actualidad aún no se cuenta con vacunas en el mercado para la prevención de la LVB, sin embargo, algunos investigadores han intentado desarrollarla con cierto agrado de éxito para reducir la transmisión de la infección (Suárez-Archilla *et al.*, 2022).

4.2.5. Métodos diagnósticos

Dada la carencia en la actualidad de inmunógenos eficientes para el control de la LVB, se recurre a la aplicación de medidas de bioseguridad, la segregación y sacrificio de animales una vez establecido el diagnóstico de la infección. El diagnóstico de la LVB se puede realizar de forma indirecta con pruebas como la de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) indirecto o de manera directa, con técnicas como la de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

4.2.5.1. Método de diagnóstico directo:

4.2.5.1.1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica de biología molecular, siendo más específica y sensible para detectar el ADN proviral de LVB en muestras de sangre, muestras de tejidos como nódulos linfáticos, linfomas o incluso en muestras de leche. Este método diagnóstico nos permite detectar y también amplificar fragmentos virales que están en un estado proviral en el torrente sanguíneo, es decir, es posible detectar el Retrovirus incluso antes de que el organismo produzca anticuerpos que sean suficientes como para ser detectado por pruebas de ELISA indirecto, lo cual favorece un diagnóstico temprano de la LVB (Felmer *et al.*, 2006; Salazar-Torres & Buitrago-Mejia, 2018).

4.2.5.2. Método de diagnóstico indirecto:

4.2.5.2.1. ELISA indirecto

Otra técnica de diagnóstico de LVB es la prueba de ELISA indirecto, ésta permite detectar anticuerpos contra las proteínas p24 o gp51 que forman parte de la estructura del virus, en los ensayos se pueden emplear por separados o de manera simultánea. Adicionalmente, el ensayo de ELISA indirecto se puede aplicar a muestras de suero sanguíneo o en muestras de leche (suero lácteo), sin embargo, esta técnica diagnóstica tiene desventajas ya que para poder detectar estos anticuerpos es necesario que estén en niveles altos; en casos donde haya una baja carga viral es muy probable que la cantidad de estos anticuerpos sea limitada y por tanto no puedan ser detectados por los kits de ELISA indirecto, generando así una frecuencia alta de resultados falsos negativos (Toma *et al.*, 1990; Salazar-Torres & Buitrago-Mejia, 2018).

5. Materiales y métodos

Para el proceso de producción de la proteína recombinante p24 se emplearon muestras de sangre total de un bovino y de sueros sanguíneo del banco de material biológico del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Las muestras procedían de bovinos identificados como seropositivos, los cuales fueron manejados de acuerdo a los criterios técnicos definidos por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario - AGROCALIDAD.

5.1. Actividad 1: Diseño de primers y construcciones genéticas

5.1.1. Materiales

5.1.1.1. Físicos y equipos

- Software libre SerialCloner versión 2.6.1 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)
- Información digital de la secuencia codificante de la proteína p24, Genbank ID: LC682198.1, región 956 a 1600 nt's (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

5.1.2. Procedimiento

Paso 1. Una vez descargada la secuencia de la región 956 a 1600 nt's del genoma del BoLV (LC682198.1) se identificó la presencia de sitios de corte con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, se encontró que la enzima NdeI si podría cortar la secuencia.

Paso 2. Se realizó el diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante de la proteína p24, se incluyó en el *primers* u oligonucleótico antisentido (Reverse) la secuencia necesaria para el reconocimiento y corte de la enzima de restricción BamHI, que permitiría la clonación el vector de expresión pET15b de manera orientada, y en el oligonucleótico sentido no se adicionó ninguna secuencia para mantener el extremo romo (no cohesivo).

Paso 3. Con las secuencias de los oligonucleóticos diseñados y las construcciones genéticas a obtener, se procedió a la gestión y adquisición del servicio de síntesis de los oligonucleótidos a la empresa Macrogen (Corea)

5.2. Actividad 2: Obtención de material genético total de muestras de sangre total de un bovino seropositivo al BoLV

5.2.1. Materiales:

5.2.1.1. Físicos y equipos

- Tubos eppendorf de varios volúmenes
- Pipetas

- Puntas
- Equipo de bioseguridad
- Centrifuga
- Cronómetro
- Vortex
- Gradillas
- Congelador (-20°C)
- Refrigerador (4°C)

5.2.1.2. Reactivos y soluciones

- Buffer de lisis (40 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 200 mM de NaCl; 8 mM de EDTA; 2 % de SDS (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, 53014, EDS y 71725))
- Solución de Proteinasa K (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM de EDTA, 50% de Glicerol, 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS; G5516 y Fisher bioReagents, Cat. no: BP1700))
- Solución de Fenol/Cloroformo/A isoamílico 25:24:1 (Sigma, Cat. no.: 77619)
- Etanol absoluto (Sigma, Cat. no.: E7148)
- Solución de Etanol al 70% (Sigma, Cat. no.: E7148 y W4502)
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502)

5.2.1.3. Biológicos

- Muestra de sangre completa de un bovino seropositivo al BoLV

5.2.2. Procedimiento:

Paso 1. Se tomó 200 µl de sangre completa y se le agregó 200 µl de la solución Buffer de lisis y 40 µl de la solución de Proteinasa K, para tener total de 440 µl.

Paso 2. Ésta mezcla fue colocada en Baño María por 14 h a una temperatura de 56 °C, posteriormente se le agregó 440 µl de la Solución de Fenol/Cloroformo/A isoamílico 25:24:1 y fueron mezcladas con la ayuda de un vortex por 10 a 15 s.

Paso 3. La mezcla fue centrifugada a 14,000 x g por 10 min, posterior a lo anterior se observó que la solución se separó en dos partes, la inferior que corresponde a la mezcla de solventes y la superior acuosa.

Paso 4. Se tomó 350 µl de la parte acuosa o sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, al cual se le agregó 875 µl de Etanol absoluto frío (4 °C).

Paso 5. Ambas soluciones se mezclaron por inversión y se sometieron a centrifugación a 14,000 x g por 10 min para formar la pastilla de los ácidos nucleicos totales, posterior a la centrifugación se decantó el sobrenadante.

Paso 6. Al precipitado o pastillas del tubo se le agregó 500 µl de la Solución de Etanol al 70 % fría (4 °C), se lavó la superficie del tubo por inversión y posteriormente se volvió a centrifugar en las condiciones arriba descritas.

Paso 7. El sobrenadante se decantó nuevamente y el precipitado con el ADN total se dejó secar a temperatura ambiente durante 12-14 h protegido del polvo y la luz directa.

Paso 8. Una vez seca la pastilla de ADN total, se disolvió en 40 µl de agua grado biología molecular, y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.3. Actividad 3: Amplificación de secuencias codificante del antígeno p24 del BoLV mediante PCR

5.3.1. Materiales

5.3.1.1. Físicos y equipos

- Set de micropipetas y sus puntas estériles
- Microtubos Eppendorf de varios volúmenes
- Tubos de PCR
- Cooler
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (-20 °C)
- Cabina de PCR
- Vórtex
- Pico fuga
- Termociclador
- Cristalería de laboratorio
- Platina de calentamiento y agitación magnética
- Potenciómetro (pH metro)
- Autoclave
- Equipo de filtración (Ø 0,22 µm)
- Vórtex
- Balanza analítica
- Cámara de electroforesis horizontal
- Horno de microondas
- Transiluminador UV
- Fotodocumentador UV (ChemiDoc XRS+ System, BioRad)

5.3.1.2. Reactivos y soluciones

- Agua grado biología molecular (Sigma Aldrich, Cat. no.: W4520)

- Enzima *Pfx* ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 11708-039) con la Solución buffer de amplificación 10X, Solución enhancer 10X y la Solución de $MgSO_4$ a 50 mM.
- Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (dNTP's set, Thermo-scientific, Cat. No.: R0182)
- Oligonucleótido sentido BLVp24For (TGCCAATCATATCTGAAGGGAATCGC) y oligonucleótido antisentido BLVp24Rev2 (GACGGATCCTTAGAGAAGTGCAGGCTGTTTCATC) (Macrogen). Estos oligonucleótidos amplifican un producto de PCR de 657 pares de bases (bp).
- Agarosa (Invitrogen, Cat. No.: 16500-500)
- Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA, pH 8,0) (Sigma Aldrich, Cat. no.: T4661, A6283, EDS, S8045)
- Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma Aldrich, Cat. no.: E7637)
- Solución buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 6 mM de EDTA, pH 8,0; 0,3 % de Azul de bromofenol; 0,3 de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma Aldrich, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516)
- Marcador de peso molecular de ADN (Invitrogen, Cat. no.: 10488058)

5.3.1.3. Biológicos

- Material genético obtenido de muestras de sangre total del bovino seropositivo al BoLV

5.3.2. Procedimiento

Paso 1. Para el proceso de amplificación de la secuencia codificante del antígeno p24 en el ensayo de PCR se elaboró una mezcla (**Tabla 1**) para alcanzar un volumen final de 25 μ l por reacción; se agitó en el vortex durante 4 a 6 s y posteriormente se centrifugó por 15 a 20 s en la picofuga.

Tabla 1. Composición de la mezcla de reacción para los ensayos de PCR para la amplificación de la secuencia codificante de p24.

Reactivo	Concentración		Volumen	
	inicial	final	de premezcla	por reacción
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	79,5 μ l	15,9 μ l
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	12,5 μ l	2,5 μ l
Enhancer 10X	10X	1X	12,5 μ l	2,5 μ l
$MgSO_4$	50 mM	2 mM	5 μ l	1 μ l
dNTP's.	10 mM c/u*	0,2 mM c/u	2,5 μ l	0,5 μ l
Primer sentido (BLVp24For)	100 μ M	0,8 μ M	1 μ l	0,2 μ l
Primer antisentido (BLVp24Rev2)	100 μ M	0,8 μ M	1 μ l	0,2 μ l
Enzima <i>Pfx</i> ADN polimerasa	25 U/ μ l	-	1 μ l	0,2 μ l
Volumen parcial			115 μ l	23 μ l
Muestra de ADN total	-	-	10 μ l	2 μ l
Volumen final			125 μ l	25 μ l

* c/u, de cada uno de los dideoxinucleotidos trifosfatados.

Paso 2. Al volumen total de las premezclas (115 µl) se le agregaron 10 µl de la muestra de ADN total obtenida de la sangre, las soluciones finales se mezclaron en el vortex, y el contenido se colectó con ayuda de la picofuga, finalmente las mezclas se dividieron en 5 microtubos (200 µl) previamente identificados, quedando un volumen final por reacción de 25 µl, posteriormente los microtubos de PCR fueron colocados en el termociclador.

Paso 3: En el termociclador las reacciones de PCR fueron sometidas al perfil de temperatura descrito en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Perfil de temperaturas de amplificación de la secuencia codificante del antígeno p24.

Etapa	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final	Almacenamiento
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Tiempo (min, ''s)	5'	30''	25''	1'30''	5'	∞
Temperatura (°C)	94,0	94,0	58,0 < 68,0	68,0	68,0	4,0

Curva de temperatura de alineamiento												
No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TM (°C)	58,0	58,3	58,9	59,8	61,1	62,4	63,6	64,9	66,2	67,1	67,7	68,0
Tubo no.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Paso 4: Una vez concluido el proceso de amplificación de la secuencia codificante, las reacciones de PCR fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1,2 % teñido con Bromuro de etidio.

Paso 5: Las imágenes de los geles fueron fotodocumentadas para su análisis.

5.4. Actividad 4: Clonación de la secuencia codificante del antígeno p24 y construcción del plásmido de expresión pET15b-p24BovLV

5.4.1. Materiales

5.4.1.1. Materiales físicos y equipos

- Set de pipetas y sus puntas estériles
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (-20 °C)
- Ultracongelador (-80 °C)
- Mechero de alcohol y recipiente con Alcohol étílico

- Palillos estériles y asa de Drigalsky
- Horno de microondas
- Centrífuga
- Microcentrífuga refrigerada
- Vórtex
- Tubos Eppendorf de varios volúmenes
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Bloque de calentamiento
- Balanza analítica
- Autoclave

5.4.1.2. Reactivos y soluciones

- Solución 5 M de NaCl (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014)
- Solución de Etanol absoluto fría (Sigma Aldrich, Cat. no.: E7148)
- Solución de Etanol al 70 % fría (Sigma Aldrich, Cat. no.: E7148, W4520)
- Agua grado biología molecular (Sigma Aldrich, Cat. no.: W4520)
- Solución 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 (Sigma Aldrich, Cat. no.: T1503, W4520)
- Solución 100 mM de IPTG (Thermo Scientific, Cat. no.: R0392)
- Solución 20 mg/ml de X-Gal (Promega, Cat. no.: V394A) en Dimetilformamida (Sigma Aldrich, Cat. no.: D4551)
- Solución 100 mg/ml de Carbenicilina (Sigma Aldrich, Cat. no.: C1389)
- Kit de purificación de plásmidos [GeneJET Plasmid Miniprep Kit] (Thermo Scientific, Cat. no.: K0503)
- Kit de purificación de ADN [GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit] (Thermo Scientific, Cat. no.: K0832)
- Caldo de cultivo LB [1% de NaCl, 1% de Triptona peptona y 0,5% de Extracto de levadura] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625)
- Placas de agar LB [1 % de NaCl, 1 % de Triptona peptona, 0,5 % de Extracto de levadura y 1,5 % de agar microbiológico] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625, A1296)
- Caldo de cultivo SOC [2 % Triptona peptona, 0.5 % Extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM de Glucosa] (Sigma Aldrich, Cat. no.: T7293, Y1625, S3014, 746436, M2670, M2643, G7021)

5.4.1.3. Materiales biológicos

- Solución del producto de PCR de la secuencia codificante del antígeno p24
- Vector o plásmido de clonación pGEM-T [pGEM-T Easy Vector System I] (Promega, Cat. no.: A1360)
- Vector de expresión pET15b (Novagen, Cat. no.: 69661-3)

- Enzimas de restricción EcoRI, EcoRV, NdeI y BamHI (Thermo-scientific, Cat. no.: ER0271, ER0301, ER0581, ER0051)
- Enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Cat. no.: 10966-030), con la Solución buffer de reacción de PCR 10X, y la Solución 50 mM de MgCl₂
- Solución de dATP a 10 mM (dNTP's set, Thermo-scientific, Cat. No.: R0182)
- Enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific, Cat. no.: EL0011)
- Cepa de *E. coli* TOP10 para clonación (Invitrogen, Cat. no.: 10368022)

5.4.2. Procedimiento

El producto de PCR de la secuencia codificante de la proteína p24 inicialmente se clonó en el plásmido de manipulación pGEM-T y a partir de esta construcción se subclonó después de reamplificar la secuencia y tratada con la enzima de restricción BamHI en el vector de expresión pET15b en los mismos sitios de restricción, modificando el extremo generado por NdeI para hacerlo romo.

Pasos a seguir:

Paso 1. Se precipitó el producto de PCR con la adición de 4 µl de la Solución 5 M de NaCl y 260 µl de la Solución de Etanol absoluto frío a 100 µl de la Solución de la reacción de PCR (ver sección 5.3.2.), se mezcló por inversión, y ésta mezcla fue centrifugada a 14.000 x g por 10 min a 4 °C. La pastilla obtenida fue lavada con 500 µl de la Solución de Etanol al 70 %, y se secó a temperatura ambiente protegida de la luz directa y el polvo.

Paso 2. Una vez seca la pastilla fue disuelta en 41,5 µl de agua grado biología molecular, se le adicionó 5 µl de la Solución buffer de reacción de PCR 10X, 2 µl de la Solución 50 mM de MgCl₂, 0,5 µl de la Solución de dATP a 10 mM y 1 µl de la enzima *Taq* DNA polimerasa. Esta mezcla fue incubada en el termociclador por 5 min a 94 °C, posteriormente a 72 °C por 30 min; para la adición de una extensión 3' de Adeninas (A-tailing) al producto de PCR y poder clonarlo en el vector pGEM-T.

Paso 3. Una vez concluido el procedimiento de *A-tailing*, la reacción se sometió al procedimiento descrito en el **Paso 1**, ajustando previamente el volumen de la solución del producto de PCR con una Solución 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0.

Paso 4. Una vez seca la pastilla fue disuelta en 15 µl de agua grado biología molecular, se tomó 3 µl de la solución del producto de PCR *A-tailed*, se colocó en tubo Eppendor de 1,5 ml y se le adicionó 5 µl de la Solución buffer de ligación 2X, 1 µl de la Solución del plásmido pGEM-T y 1 µl de la Solución de la enzima T4 DNA ligasa (3 Unidades Weiss/µl). Los reactivos anteriores se mezclaron el vortex por 10 s y el volumen total de la reacción fue colectado con la picofuga, y finalmente la reacción se incubó por 16 h (Toda la noche) en refrigeración (4 °C).

Paso 5. Al siguiente día una vez concluido el periodo de incubación de la reacción de ligación, la mezcla de reacción se usó para transformar la cepa TOP10 de *E. coli* previamente preparada con Ca^{+2} para ser transformada mediante choque térmico.

Paso 6. Para la transformación se tomó un vial con (50 μl) la cepa TOP10 de *E. coli* Ca^{+2} -competente (almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se descongeló en frío, se le adicionó el volumen total (10 μl) de la reacción de ligación, la mezcla se incubó por 30 min en frío, posteriormente se aplicó un choque térmico por 1 min a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el bloque térmico. Para recuperar las bacterias la reacción de transformación se incubó por 2 min en frío, y se le adicionó 45 μl del medio SOC al que previamente se le ajustó la temperatura a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Paso 7. Para favorecer la recuperación de la cepa bacteriana, a continuación, se dejó en incubación y agitación (200 r.p.m.) a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 min. Una vez concluida el periodo de incubación, se tomaron 250 μl de la suspensión bacteriana y se dispersaron con el asa de Drigalsky en 2 placas de agar LB con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Carbenicilina previamente atemperadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la adición y dispersión de 40 μl de la Solución de X-Gal.

Paso 8. Las placas inoculadas con la reacción de transformación se incubaron por 18 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en estático. Una vez concluido este periodo de incubación las placas fueron revisadas, y se identificó la presencia de colonias blancas y azules. Se seleccionaron 4 colonias blancas, se tomaron con la ayuda de un palillo moadientes (*toothpick*) estéril y fueron transferidas a un tubo Falcon (15 ml) con 5 ml de caldo LB con 100 μl de Carbenicilina, estos cultivos se incubaron durante toda la noche (16 h) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación constante (200 r.p.m.).

Paso 9. De los cultivos líquidos se obtuvo la biomasa bacteriana mediante centrifugación a $4.500 \times g$ por 15 min a temperatura ambiente. A las muestras de biomasa bacteriana se les extrajo el plásmido con el Kit de purificación de plásmidos (GeneJET Plasmid Miniprep Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución de los plásmidos se realizó con 50 μl de agua grado biología molecular.

Paso 10. Para verificar la clonación de producto de PCR correspondiente a la secuencia codificante, se realizó un mapa de restricción con el uso de la enzima EcoRI, para lo cual se tomó 8 μl de la solución de los plásmidos de cada una de las clonas y se colocaron en un tubo Eppendorf (0,5 ml), se les adicionó 1 μl de la Solución buffer 10X correspondiente a la enzima y 1 μl de la Solución de la enzima de restricción EcoRI. Finalmente, las mezclas de digestión fueron incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en estático por 1 h.

Paso 11. Una vez concluida la digestión, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1,2 % teñido con Bromuro de etidio. Las imágenes de los geles fueron fotodocumentadas para su análisis.

Paso 12. De una de los clones positivas a la presencia del producto de PCR se tomó para reamplificar la secuencia codificante (Ver sección 5.3.), el producto de PCR después de ser purificado (Ver sesión 5.4.2., Paso 1.), fue digerido con la enzima de restricción BamHI (Ver Paso 10). Por otro lado, para el caso del plásmido de expresión pET15b, se tomó 8,5 µl de la solución del plásmido pET15b, se colocaron en un tubo Eppendorf (0,5 ml), se le adicionó 1 µl de la Solución buffer 10X correspondiente a la enzima y 0,5 µl de la Solución de la enzima de restricción NdeI. La mezcla de las reacciones de digestión fueron incubadas en las condiciones antes descritas (Ver Paso 10).

Paso 13. Una vez concluido el tiempo de incubación de la reacción de digestión del plásmido pET15b, el material genético fue recuperado siguiendo el procedimiento descrito en el Paso 1, y tratado con la enzima ADN polimerasa *Pfx* (Ver sección 5.3.) para posteriormente, recuperar el material genético (Ver Paso 1, de esta sección) y disolverlo en 8,5 µl de agua grado biología molecular y realizar la digestión con la enzima de restricción BamHI, siguiendo el procedimiento descrito en el paso anterior (Paso 12).

Paso 14. Las muestras del del producto de PCR (pGEMT-p24BoLV) digerido con BamHI el plásmido pET15b doblemente digeridos (NdeI y BamHI) fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1,2 % teñido con Bromuro de etidio. Del gel obtenido se recuperaron las porciones del mismo donde se localizaron el inserto (p24) y el vector (pET15b), de ambos fragmentos se recuperó el material genético con el uso el kit de purificación de ADN (GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante. El material genético fue precipitado de acuerdo al procedimiento descrito en el Paso 1.

Paso 15. Una vez seco el material genético correspondiente a la mezcla del inserto y el vector de expresión éste fue disuelto en 8,5 µl de agua grado biología molecular, y se le adicionó 1 µl de la Solución buffer de ligación 10X y 0,5 µl de la Solución de la enzima ADN ligasa T4. La reacción de ligación se incubó durante toda la noche a 4 °C en estático.

Paso 16. La reacción de ligación se usó para transformar la cepa de *E. coli* TOP10, realizando la selección de las transformantes agar LB con 100 µg/ml de Carbenicilina. Para identificar clones recombinantes se seleccionaron 4 colonias y se aplicó el procedimiento descrito en los Pasos 8, 9, 10 y 11, con el uso de la enzima restricción EcoRV para la realización del mapa de restricción.

5.5. Actividad 5: Generación de la cepa de expresión recombinante *E. coli* Rosetta 2 (DE3) con el plásmido pET15b-p24BoLV

5.5.1. Materiales:

5.5.1.1. Materiales físicos y equipos

- Set de pipetas y sus puntas estériles
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (-20 °C)
- Ultracongelador (-80 °C)
- Mechero de alcohol y recipiente con Alcohol etílico
- Palillos mondadientes estériles y asa de Drigalsky
- Centrífuga
- Microcentrífuga refrigerada
- Vórtex
- Tubos Eppendorf de varios volúmenes
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml
- Bloque de calentamiento
- Cristalería de laboratorio
- Incubadora bacteriológica con agitador
- Balanza analítica
- Autoclave
- Potenciómetro (pHmetro)
- Sonicador (Qsonica, Modelo Q125)
- Cámara de electroforesis vertical
- Platina de calentamiento
- Fotodocumentador (Molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System, Bio-Rad)
- Software de adquisición y análisis de imagen (Image Lab Versión 5.2.1, Bio-Rad)

5.5.1.2. Reactivos y soluciones

5.5.1.2.1. Reactivos y soluciones para la generación de la cepa recombinante

- Solución 1 M de IPTG (Thermo Scientific, Cat. no.: R0392)
- Solución 100 mg/ml de Ampicilina (Fisher BioReagents, Cat. no.: BP1760)
- Solución 100 mg/ml de Carbenicilina (Sigma Aldrich, Cat. no.: C1389)
- Caldo de cultivo LB [1% de NaCl, 1% de Triptona peptona y 0,5% de Extracto de levadura] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625)
- Placas de agar LB [1 % de NaCl, 1 % de Triptona peptona, 0,5 % de Extracto de levadura y 1,5 % de agar microbiológico] (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, T7293, Y1625, A1296)
- Caldo de cultivo SOC [2 % Triptona peptona, 0.5 % Extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM de Glucosa] (Sigma Aldrich, Cat. no.: T7293, Y1625, S3014, 746436, M2670, M2643, G7021)
- PBS 10X, pH 7,6 [137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1,76 mM KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, 746436, P0662; Fisher Scientific, S472)

- DTT o Dithiothreitol (Bio-Rad, Cat. no.: 1610610)
- Solución de lisis (PBS 1X, pH 7, 6 con 2 mM de DTT).

5.5.1.2.2. Para la resolución de las proteínas mediante SDS-PAGE

- Agua destilada estéril
- Solución resolving buffer 4X [1.500 mM de Tris-HCl, pH 8,8 y 0,4% de SDS] (Sigma, Cat. no.: T4661, 71725; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)
- Solución stacking buffer 4X [1,500 mM de Tris-HCl, pH 6,8 y 0,4 % de SDS] (Sigma, Cat. no.: T4661, 71725; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)

Solución de Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1 al 30 % (Bio-Rad, Cat. no.: 161015)

- Solución al 10 % de Persulfato de amonio [0,1 g/ml de Persulfato de amonio] (Sigma, Cat. no.: A3678)

Solución TEMED [N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diamina] (Bio-Rad, Cat. no.: 161-08.01))

- Solución buffer para SDS-PAGE [25 mM de Tris base; 1 % de SDS; 191 mM de Glicina] (Sigma, Cat no: T4661, 71725; Bio-Rad, No. cat.: 161-0718)
- Solución buffer de muestras SDS-PAGE 2X [125 mM de Tris-HCl, pH 8,8; 4 % de SDS; 5 % de β -Mercaptoetanol; 20 % de Glicerol; 0,0025 % de Azul de bromofenol] (Sigma, Cat. no.: T4661, 71725, 63689, G5516, B8026; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)
- Marcador de peso molecular para proteínas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. no.: 26616)
- Solución de tinción con Azul brillante de Coomassie [80 mg/l de Azul de brillante de Coomassie G250 y 35 mM de HCl] (Bio-Rad, Cat. no.: 161-0406; Fisher, Cat. no.: 7647-01-0)

5.5.1.3. Biológicos

- Cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Sigma-Aldrich, No. cat.: 71397)
- Construcción genética o plásmido pET15b-p24BovLV

5.5.2. Procedimiento

Una vez que se verificó la obtención del plásmido pET15b-p24BoLV, éste se empleó para transformar la cepa de expresión de *E. coli* Rosetta 2 (DE3)

Paso 1. Para la transformación de la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) se realizaron los **Pasos 5-7**, descritos en la sección **5.4. Actividad 4**, con la excepción de que se emplearon placas de agar LB con 100 μ g/ml de Carbenicilina y 1 % de Glucosa).

Paso 2. Posterior a la incubación de las placas, se seleccionaron al azar 4 colonias bacterianas de las placas de cada una de cepas recombinantes y se inocularon en 50 ml de caldo LB con 100 μ g/ml de Ampicilina, los matraces inoculados se incubaron por 3 h a 37 °C en agitación constante (200 r.p.m.), transcurridas 3 h, se le adicionó el inductor (IPTG) para

tener una concentración final de 100 μ M. Nuevamente los cultivos se colocaron en la incubadora en las condiciones antes descritas durante toda la noche (14 h).

Paso 3. Concluido el periodo de inducción, la biomasa bacteriana inducida se cosechó por centrifugación a 4.500 x *g* por 15 min a temperatura ambiente. La pastilla bacteriana obtenida se resuspendió en 1 ml de la Solución de buffer de lisis, pH 7.6.

Paso 4. La biomasa cosechada se lisó por sonicación (2 pulsos de 30 s, a 75 % de intensidad, con un intervalo de descanso de 30 s).

Paso 5. Para la obtención de la fracción soluble e insoluble, el extracto total de la biomasa lisada fue centrifugado a 20.000 x *g* por 10 min a 4 °C. Una vez concluida la centrifugación el sobrenadante fue retirado cuidadosamente y colocado en un tubo nuevo, y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de Solución de buffer de lisis, pH 7.6.

Paso 6. Una alícuota de 50 μ l del extracto total, la fracción soluble (sobrenadante) e insoluble (sedimento) fueron mezcladas con un volumen similar de la Solución buffer de muestras SDS-PAGE 2X, y sometidas a ebullición durante 5 min en baño María.

Paso 7. Las muestras de las fracciones proteicas fueron resueltas mediante SDS-PAGE discontinuo al 12 %, una vez concluida la resolución (Gel concentrador 60 Voltios/Gel concentrador 120 Voltios, para la preparación del gel ver **Nota 1**), el gel fue retirado del molde y colocado en la Solución de tinción de Azul brillante de Coomassie, calentado varias veces la solución en el horno de microondas, evitando que la solución entre en ebullición, hasta hacer evidente la presencia de las bandas de las proteínas resueltas.

Paso 8. Concluida la tinción del gel, se retiró la Solución de tinción de Azul brillante de Coomassie y el gel se lavó con agua destilada 3 veces para retirar los restos del colorante.

Paso 9. El gel teñido de esta manera fue fdocumentado y se analizó la presencia de la expresión del antígeno p24.

Nota 1. Preparación del gel para SDS-PAGE

Paso 1. Para la resolución de las muestras de proteínas se preparó un gel discontinuo desnaturizante de poliacrilamida al 12 %, para el gel resolutivo (*Resolving*) se colocaron en un recipiente limpio (Tubo Falcon de 50 ml) los siguientes reactivos, previo al armado de las placas con los aditamentos para formar el gel (Gel casting system):

Tabla 3. Mezcla de reactivos para el gel separador.

Reactivo:	Número de geles (Volumen del reactivo):	
	Un gel (ml)	Dos geles (ml)
Agua destilada estéril	2.625	5.250
Solución resolving buffer 4X	1.875	3.750
Solución de Acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 30%	3.000	6.000
Solución al 10% de Persulfato de amonio	0.025	0.050

Solución TEMED	0.002	0.005
Volumen total	7.027	15.055

Paso 2. Se mezclaron cuidadosamente los reactivos, evitando en lo posible la formación de espuma y de la misma manera se transfirieron a los moldes de los geles, hasta la marca previamente colocada para definir la longitud del gel. Se adicionó un poco de agua destilada estéril para evitar la evaporación del agua del gel y el ingreso de Oxígeno, y se esperó el tiempo suficiente para permitir la polimerización del gel.

Paso 3. Una vez polimerizado el gel resolutivo se preparó el gel concentrador (*Stacking*), para lo cual se adicionaron en un recipiente limpio (Tubo Falcon de 50 ml) los siguientes reactivos:

Tabla 4. Mezcla de reactivos para el gel concentrador.

Reactivo:	Número de geles (Volumen del reactivo):	
	Un gel (ml)	Dos geles (ml)
Agua destilada estéril	1.445	2.890
Solución stacking buffer 4X	0.625	1.250
Solución de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 30%	0.375	0.750
Solución al 10% de Persulfato de amonio	0.050	0.100
Solución TEMED	0.005	0.010
Volumen total	2.500	5.000

Paso 4. Se mezclaron los reactivos con excepción del TEMED. Se retiró el agua adicionado al gel resolutivo, se colocaron los peines para formar los pozos en un formato de gel preparativo. Se adicionó al gel concentrador, se mezcló cuidadosamente para evitar la formación de espuma y rápidamente se transfirió a los moldes de los geles. Se adicionó un poco de agua destilada estéril y se esperó el tiempo suficiente para permitir la polimerización del gel.

Paso 5. Una vez preparados los geles, se colocaron en la cámara de electroforesis, se adicionó la Solución buffer de electroforesis SDS-PAGE, y se cargaron las muestras.

5.6. Actividad experimental 6: Purificación IMAC del antígeno recombinante p24

5.6.1. Materiales

5.6.1.1. Materiales físicos y de laboratorio

- Cristalería de laboratorio
- Balanza analítica
- Potenciómetro (pHmetro)
- Set de micropipetas de varios volúmenes y sus puntas estériles

- Platina de agitación y balas magnéticas
- Vortex
- Refrigerador (4 °C)
- Columna plástica (Thermo Scientific, Cat. no.: 89898)
- Soporte universal
- Gradillas y tubos de vidrio
- Refrigerador (4 °C)

5.6.1.2. Reactivos y soluciones

- H₂O destilada
- Resina HisPur Ni-NTA Superflow Agarose (Thermo Scientific, Cat. no.: 25215)
- PBS 10X, pH 7,6 [137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1,76 mM KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, 746436, P0662; Fisher Scientific, S472)
- DTT o Dithiothreitol (Bio-Rad, Cat. no.: 1610610)
- Solución 1 M de Imidazol (Acros organics, Cat. no.: 12292-1000)
- Solución buffer de lisis (PBS 1X, pH 7,6 con 2 mM de DTT)
- Solución buffer de lavado (PBS 1X, pH 7,6 con un total de 500 mM de NaCl, 5 mM de Imidazol y 2 mM de DTT)
- Solución buffer de elución (PBS 1X, pH 7,6 con 500 mM de Imidazol y 2 mM de DTT)

5.6.1.3. Materiales biológicos

- Fracción proteica soluble con el antígeno p24, de la biomasa inducida

5.6.2. Procedimiento

Una vez obtenida la fracción soluble de la biomasa inducida de la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3): pET15b-p24BoLV, se realizó la purificación del antígeno p24 por IMAC.

Paso 1. Una vez preparadas las soluciones necesarias para el proceso de purificación por IMAC, se preparó la columna con 4 ml de la resina (HisPur Ni-NTA Superflow Agarose).

Paso 2. La resina se lavó 2 veces con 4 volúmenes de agua destilada (8 ml), y se procedió al equilibrio de la resina con la adición (2 veces) de 2 volúmenes (4 ml) de la Solución buffer de lisis.

Paso 3. Con la resina equilibrada se continuó con la adición de 2 volúmenes (4 ml) de la fracción proteica soluble de la biomasa inducida. El efluente (No pegado) de la columna fue colectado en un tubo de vidrio, el cual se mantuvo en frío (4 °C).

Paso 4. Se realizaron los lavados (5 en total) de la resina con 4 volúmenes (8 ml) de la Solución buffer de lavado, cada fracción de lavado fue colectada por separado (Lavado 1, 2, 3, 4 y 5).

Paso 5. Continuando con el proceso de purificación, para eluir la proteína se le adicionó a la resina 1 volumen (2 ml) de la Solución buffer de elusión, éste paso se repitió una vez más (Para volumen total de elusión 4 ml).

Paso 6. Para finalizar el proceso, se realizó un lavado final de la resina, agregando 4 volúmenes de agua destilada (8 ml) y de la misma manera se colectó esta fracción.

Paso 7. Una vez concluido el proceso, la resina se almacenó a 4 °C en agua destilada, y en las mismas condiciones fueron almacenadas las fracciones colectadas de la IMAC hasta verificar la purificación del antígeno p24 mediante SDS-PAGE.

5.7. Actividad experimental 7: Diálisis, cuantificado y almacenado de las fracciones proteicas con el antígeno p24

5.7.1. Materiales

5.7.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Set de pipetas y sus puntas estériles
- Balanza analítica
- Potenciómetro (pHmetro)
- Refrigerador (4 °C)
- Vórtex
- Tubos Eppendorf de varios volúmenes
- Tubos Falcon de 15 ml
- Cristalería de laboratorio
- Membrana SnakeSkin® Dialysis Tubing-7,000 MWCO (Molecular Weight CutOff)
- Tijeras, Clamps plásticos y Hilo grueso
- Recipientes de plástico
- Platina de agitación y balas magnéticas
- Cámara de electroforesis vertical
- Platina de calentamiento
- Fotodocumentador (Molecular Imager Gel Doc XR+ Imaging System, Bio-Rad)
- Software de adquisición y análisis de imagen (Image Lab 5.2.1, Bio-Rad)
- Jeringas (10 ml) y filtros (Ø de 0,22 µm) (Nest Scientific USA Inc., Cat. no.: 380111)

5.7.1.2. Reactivos y soluciones

- PBS 10X, pH 7,4 [137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1,76 mM KH₂PO₄ (Sigma Aldrich, Cat. no.: S3014, 746436, P0662; Fisher Scientific, S472)
- Solución de diálisis (PBS 1X, pH 7,4)
- Agua destilada

5.7.1.1. Materiales biológicos

- Fracciones eluídas de ambos lotes de las fracciones solubles.
- Proteína sérica bovina (BSA) fracción V, previamente cuantificada

5.7.2. Procedimiento

Las fracciones proteicas con el antígeno p24 se dializó para colocar a la proteína en una Solución buffer (PBS 1X, pH 7,4) compatible para su posterior uso en ensayos biológicos, una vez preparada fue cuantificada mediante análisis densitométrico de la proteína resuelta mediante SDS-PAGE para tener una estimación de la concentración y los rendimientos volumétricos.

Paso 1. Con la solución de diálisis ya preparada (2.000 ml de PBS 1X, pH 7,4) se hizo la hidratación y lavado de la membrana de diálisis con agua destilada.

Paso 2. A continuación, se selló un extremo de la membrana con un *clamp* plástico y se procedió a la fracción proteica obtenida de los lavados 3, 4 y 5, en donde previamente se había identificado la presencia de la proteína p24. Se selló el otro extremo de la membrana de diálisis con otro *clamp*, y se aseguró ambos extremos con ayuda de una porción de hilo. El mismo procedimiento fue aplicado para la fracción eluida, donde también se evidenció la presencia del antígeno p24.

Paso 3. Las fracciones proteicas fueron colocadas en las membranas de diálisis se transfirieron al recipiente con los 2 l de la Solución de diálisis, manteniendo en constante movimiento la solución con ayuda de la platina de agitación y una bala magnética. Después de aproximadamente un intervalo de 8 a 10 h se realizan 2 cambios de la Solución de diálisis con el objetivo de reducir al mínimo la concentración de Imidazol, DTT y ajustar el pH.

Paso 4. Una vez concluido el dializado de las fracciones proteicas, se retiraron las soluciones de las membranas de diálisis y se colocaron en un frasco estéril de vidrio y tapón de caucho, de 15 ml.

Paso 5. Para iniciar el proceso de cuantificación, las fracciones dializadas fueron resueltas mediante SDS-PAGE siguiendo los pasos (**Paso 6 a 9**) descritos en la sección 5.5.2., junto a las muestras de la curva de calibración de BSA (50, 100, 200, 300 y 400 µg/ml).

Paso 6. Con la imagen del gel se procesó y analizó para estimar la concentración del antígeno p24 de ambas fracciones, siguiendo las instrucciones del software de adquisición y análisis de imágenes (Image Lab 5.2.1, Bio-Rad). Los valores de concentración y los volúmenes de las fracciones proteicas dializadas del antígeno p24, se emplearon para la estimación de los rendimientos volumétricos.

Paso 7. Ambas fracciones obtenidas con el antígeno p24 se mantuvieron almacenados en refrigeración después de ser esterilizados por filtración y empleadas en el ensayo de ELISA indirecto.

5.8. Actividad 8: Evaluación del reconocimiento del antígeno recombinante p24 por anticuerpos bovinos

5.8.1. Materiales

5.8.1.1. Físicos y equipos de laboratorio

- Placas de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc, No. cat.: 442404)
- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas
- Recipientes de vidrio para la preparación de soluciones
- Agitador orbital
- Potenciómetro (pHmetro)
- Balanza analítica
- Lector de placas de ELISA
- Computadora

5.8.1.2. Materiales químicos y/o soluciones

- Solución para la sensibilización de las placas: Buffer de carbonatos (Para 10 ml, se mezcló 3,4 ml de la Solución *stock* 100 mM de Na_2CO_3 (Merck, No. cat.: 106393); con 1,6 ml de la Solución 100 mM de NaHCO_3 (Merck, No. cat.: 144558), y se aforó a 10 ml con agua destilada y las fracciones proteicas respectivas para tener una concentración final de 50 mM, pH 9.6 con 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del antígeno p24 (250 ng o 0,25 μg por pozo)
- Solución salina buferada de fosfatos (PBS), pH 7,4 (137 mM de NaCl (Sigma, No. cat.: S3014); 2,7 mM KCl (Sigma, No. cat.: 746436); 10 mM NaH_2PO_4 (Fisher, No. cat.: S369-1); 1,8 mM KH_2PO_4 (Sigma, No. cat.: P0662), pH 7.4)
- Solución para el lavado de las placas (PBS-T0.05) (PBS, pH 7,4 y 0,05 % de Tween 20 (Sigma, No. cat.: P1379))
- Solución para el bloqueo de las placas (PBS-T0.05-M1) (PBS-T0.05; 1 % (p/v) de Leche descremada en polvo (Ahold® Instant Nonfat Dry Milk, Foodhold U.S.A.))
- Solución para la dilución de los sueros ((PBS-T0.05-M1) (PBS-T0.05; 1 % de Leche descremada (Ahold® Instant Nonfat Dry Milk, Foodhold U.S.A.))
- Solución para la detección de anticuerpos (PBS-T0.05-M1; Proteína G-HRP (Horseradish peroxidase) (EMD Millipore, No. cat.: 18-161) diluida 1:5.000 en la Solución para la dilución de sueros
- Solución del sustrato para la peroxidasa [Solución de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)] (100 mM de Ácido cítrico (Sigma, No. cat.: 791725), 100 mM Acetato

de sodio (Sigma, No. cat.: S2889) pH 5,0; 0,5 mg/ml de TMB (Sigma, No. cat 860336) y 1:2.000 (v/v) de una solución de H_2O_2 al 30 % (Fisher, No. cat H325-4)

Nota: Para preparar la Solución del sustrato, se disolvió en 1 ml de Dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma, No. cat.: 860336) 50 mg de TMB (Sigma, No. cat.: 860336) y luego se diluyó 1:100 en la Solución buffer de Acetato-citrato 100 mM, pH 5.0. Se le adicionó Peróxido de hidrógeno para tener una dilución de 1:2,000 (v/v) de una solución de H_2O_2 al 30 % (Fisher, No. cat H325-4)

- Solución de paro para la solución de sustrato (2 M de Ácido sulfúrico (Pharmaco-Aaper, No. cat.: 290000ACS))

Nota: Para preparar una solución 2 M (molar) de Ácido sulfúrico (H_2SO_4) en 0,1 litro de solución usando Ácido sulfúrico concentrado con una pureza del 97,0 % y una densidad de 1,83 g/ml, se necesitó calcular el volumen de Ácido sulfúrico concentrado, de acuerdo a:

Se calculó la masa molar (peso molecular) del Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Fisher, No. cat H325-4): $\text{H}_2\text{SO}_4 = 2(1.01 \text{ g/mol}) + 1(32.07 \text{ g/mol}) + 4(16.00 \text{ g/mol}) = 98,09 \text{ g/mol}$

Se determinó la cantidad de moles necesarios para una solución 2 M en 0,1 litro (100 ml):

Moles de $\text{H}_2\text{SO}_4 = 2 \text{ M} \times 0,1 \text{ l} = 0,2 \text{ moles}$

Luego se calculó la masa de Ácido sulfúrico necesaria:

Masa = Moles $\times$ Masa molar = $0,2 \text{ moles} \times 98,09 \text{ g/mol} = 19,62 \text{ g}$.

Dado que el Ácido sulfúrico concentrado tiene una pureza del 97,00 %, fue necesario tener en cuenta las impurezas. Se utilizó la siguiente ecuación para calcular la masa de Ácido concentrado necesaria para obtener 0,2 moles de H_2SO_4 puro: Masa de H_2SO_4 concentrado = (Masa de H_2SO_4 puro) / (Concentración de H_2SO_4 en la solución concentrada) = $19,62 \text{ g} / 0,97 = 20,22 \text{ g}$

Para tener el cálculo del volumen de Ácido sulfúrico concentrado necesario utilizando su densidad (1,83 g/ml): Volumen = Masa / Densidad = $20,216 \text{ g} / 1,83 \text{ g/ml} \approx 11,02 \text{ ml}$.

A una probeta (100 ml) con $\approx 80 \text{ ml}$ de agua destilada se le agregó cuidadosamente el volumen calculado de Ácido sulfúrico concentrado (11,02 ml)

Con cuidado, mientras se mezcla con ayuda de una platina con agitación magnética, se agregó más agua destilada hasta un volumen final de 0,1 litro (100 ml) dando como resultado una solución 2 M de Ácido sulfúrico. Se lo mantuvo almacenado a temperatura ambiente, protegida de la luz solar directa

5.8.1.3. Materiales biológicos

- Veintiséis muestras de suero sanguíneo proporcionados por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, procedentes de bovinos definidos como seropositivos al BoLV mediante un ensayo de ELISA indirecto comercial.

- Antígeno recombinante p24 del BovLV de las fracciones de los lavados y la elusión

5.8.2. Procedimiento

Paso 1: Para el ensayo ELISA indirecto se inició con la sensibilización de placas (MaxiSorp). Para realizar la solución sensibilizadora se preparó un total de 10 ml de solución para la proteína rHT-p24 de BoLV, a una concentración de 2.5 µg/ml. A la placa se le adicionó 100 µl en cada pozo, para luego incubarla por toda la noche (14-16 h) a una temperatura de 4 °C, en estático.

Paso 2: Al finalizar la incubación se retiró la solución sensibilizadora de las placas, para continuar con el bloqueo de esta, se colocó 150 µl de la solución de bloqueo en cada pozo, para después ser incubada por 1 hora a una temperatura de 23 a 25 °C en estático.

Paso 3: Una vez concluido el bloqueo de las placas, se realizó un lavado de las placas con la respectiva solución de lavado, durante 5 min en agitación a temperatura ambiente. Luego del lavado se colocó 100 µl de la solución con cada uno de los sueros, a una dilución de 1:50 en la solución para dilución.

Paso 4: Las placas con las muestras de sueros se incubaron por 1 hora, en agitación constante a temperatura ambiente, acabada la incubación se realizó tres lavados, de 5 min con la solución de lavado.

Paso 5: Luego de los lavados, se adicionó 100 µl de la solución con la Proteína G-HRP, y se las incubó por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante.

Paso 6: Posteriormente se hizo el lavado correspondiente con la solución de lavado, 3 lavados de 5 min por cada lavado.

Paso 7: A continuación, se adicionó 100 µl de la solución de Sustrato TMB en la placa, para incubarlas por unos 15 (hasta 30) minutos a temperatura ambiente, en estático y protegido de la luz.

Paso 8: Finalizado el periodo de la incubación se realizó la lectura en el lector de placas de ELISA. Para el caso del Sustrato TMB antes de realizar su lectura a una longitud de onda de 450 nm se adicionó 50 µl de la Solución de paro.

5.9. Actividad 9: Análisis estadístico del reconocimiento de las dos fracciones proteicas con el antígeno recombinante p24 por anticuerpos bovinos

5.9.1. Materiales

5.9.1.1. Físicos y equipos de laboratorio

- Computadora personales
- Software libre KyPlot 5.0. versión 5.0.3, (<https://www.kyenslab.com/en-us/>)

5.9.2. Procedimiento

Paso 1: Una vez tabulado los datos de las densidades ópticas del ensayo de ELISA indirecto con ambas fracciones proteicas con el antígeno p24, se hizo el contraste mediante la Prueba T con muestras no independientes, y finalmente se realizó el gráfico *Dot-box plot* con el mismo software libre KyPlot 5.0. versión 5.0.3, (<https://www.kyenslab.com/en-us/>).

6. Resultados

De acuerdo la bibliografía consultada en la que se reporta la clonación y expresión de la proteína p24 del BoLV, se hizo el diseño de los oligonucleótidos o *primers* para la amplificación de la secuencia codificante (GenBank ID: NC_001414.1) y su posterior clonación en el vector de expresión pET15b con el uso de la enzima de restricción BamHI (Ver **Figura 2A**). Con los oligonucleótidos diseñados se amplificó la secuencia codificante mediante PCR, obteniéndose un aplicón de 657 bp, el cual fue clonado en el vector pGEM-T siguiendo las instrucciones del fabricante, para obtener el plásmido pGEMT-p24BoLV (Ver **Figura 2B**).

De una de las clonas obtenidas del plásmido pGEMT-p24BoLV se reamplificó la secuencia codificante de p24, y el amplicón se sometió a digestión con la enzima de restricción BamHI; la secuencia obtenida fue ligada al vector de expresión pET15b el cual previamente también había sido digerido con NdeI, tratado con la ADN polimerasa *Pfx* para generar un extremo romo y finalmente digerido con la enzima BamHI, para tener el plásmido recombinante pET15b-p24BoLV (Ver **Figura 2C**). Una vez identificadas clonas del plásmido pET15b-p24BoLV, una de ellas se usó para transformar mediante choque térmico la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) para la expresión del antígeno recombinante p24 el cual tiene incorporado una secuencia o *tag* de Histidinas en el extremo amino para su posterior purificación mediante IMAC.

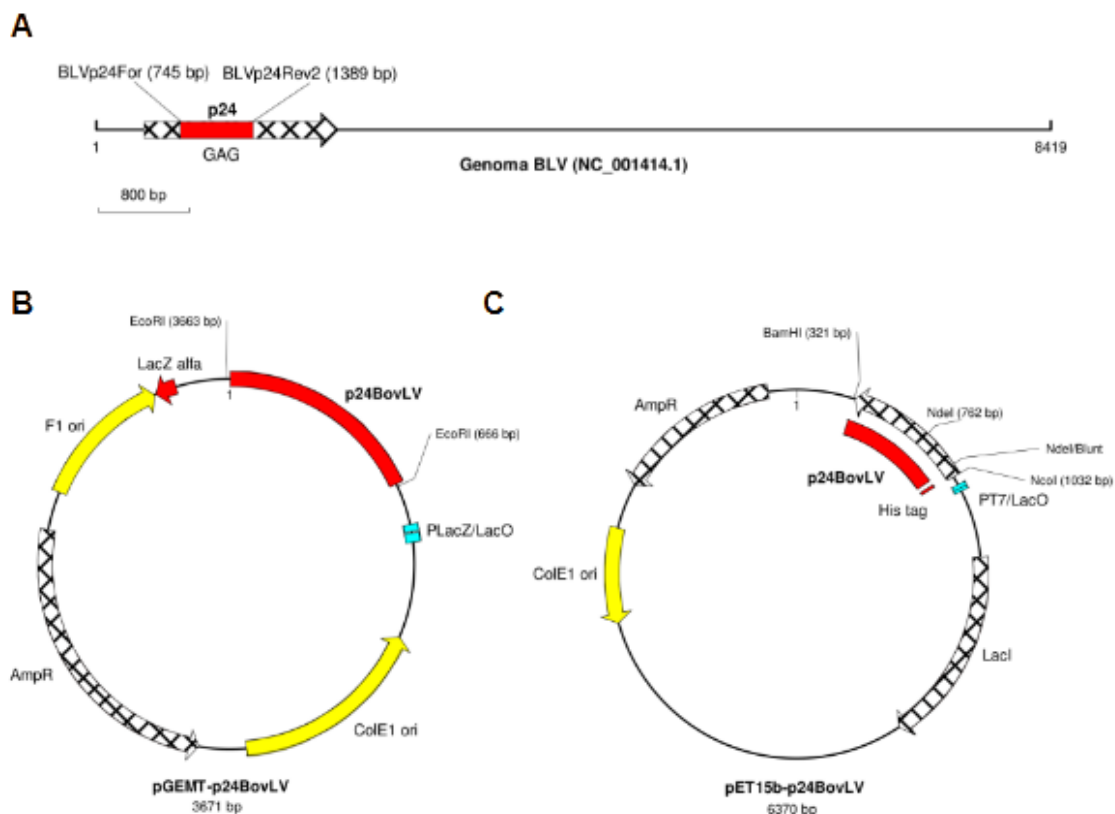


Figura 2: Proceso de amplificación, clonación de la secuencia codificante de la proteína p24 del BoLV y generación del plásmido de expresión pET15b-p24BoLV **A.** Diagrama de la secuencia genoma del BoLV (GenBank ID: NC_001414.1) en donde se muestra la localización de la poliproteína GAG, la proteína p24 y la región amplificada con los oligonucleótidos BLVp14For y BLVp14Rev2 diseñados para la posterior clonación en el vector pET15b con la enzima de restricción BamHI; **B.** Plásmido pGEMT-p24BoLV; **C.** Vector de expresión pET15b-p24BoLV.

De las transformantes obtenidas de la cepa Rosetta 2 (DE3) con el plásmido pET15b-p24BoLV se seleccionaron 4 colonias, las cuales fueron cultivadas individualmente en 50 ml de medio LB (Luria Bertani) con 100 µg Carbenicilina por ml, e incubadas durante 3 h a 37 °C en agitación constante (200 r.p.m.), una vez transcurrido las 3 h se adicionó el inductor (IPTG) para tener una concentración final de 100 µM, y posteriormente se dejó el cultivo en las condiciones antes descritas durante toda la noche (14 h aproximadamente). Los cultivo inducidos se cosechó la biomasa bacteriana mediante centrifugación, y se realizó el fraccionamiento de la biomasa por sonicación (3 pulsos de 30 s, a 75 % de intensidad, con un intervalo de descanso de 30s), , el extracto obtenido fue centrifugado a 20.000 x g durante 10 min a 4 °C. Posterior a la centrifugación se tomó el sobrenadante, considerándolo como la fracción soluble y el sedimento como la insoluble. Las fracciones obtenidas de las 4 colonias evaluadas fueron resueltas mediante una SDS-PAGE, observándose una banda (Ver **Figura 3**) en las fracciones solubles de un tamaño molecular similar al predicho del péptido recombinante p24.

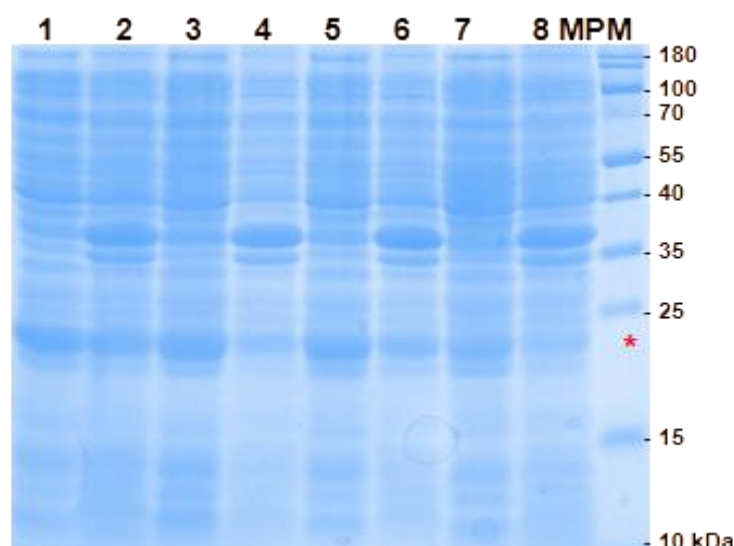


Figura 3: SDS-PAGE de las fracciones de 4 colonias de la cepa Rosetta 2 (DE3): pET15b-p24BovLV. Carriles 1, 3, 5 y 7, fracciones solubles; carriles 2, 4, 6 y 8, fracciones insolubles; carril MPM, marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. no.: 26616).

De acuerdo a lo obtenido, integraron las fracciones solubles de las 4 colonias bacterianas evaluadas y realizar la purificación IMAC. Las fracciones obtenidas en el proceso de purificación IMAC fueron resueltas mediante SDS-PAGE (Ver **Figura 4**), en la que se observó en los carriles correspondientes a las fracciones de lavados (3, 4 y 5, *) y de la elusión (**) una banda intensa en la zona de tamaño esperado del péptido p24, entre 15 y 20 kDa. Por lo anterior se procedió a la diálisis de las fracciones, lavados 3, 4 y 5, y elusión.

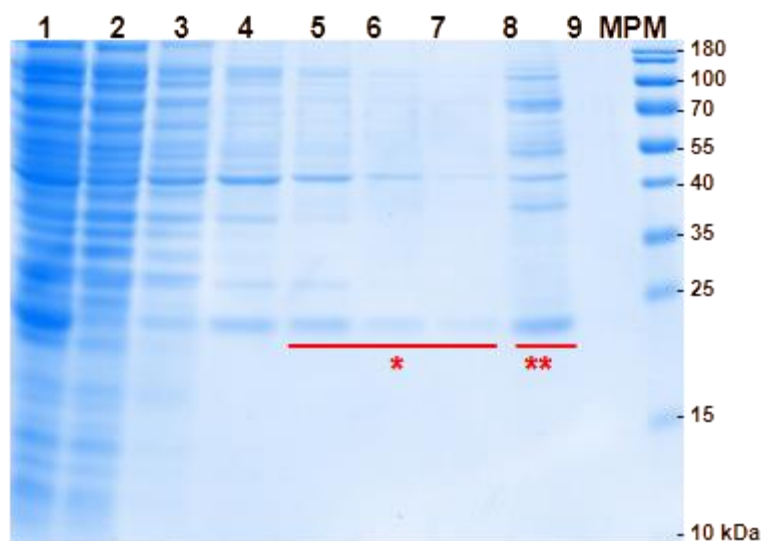


Figura 4: SDS-PAGE de las fracciones proteicas obtenidas de la purificación IMAC. Carril 1, fracción soluble; carril 2, fracción no pegada, carriles 3, 4, 5, 6 y 7, fracciones de los lavados 1, 2, 3, 4, y 5 de la resina; carril 8, fracción proteica de la elusión, carril 9, lavado final de la resina; y carril MPM, marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. no.: 26616).

Las fracciones de los lavados y de la elusión fueron dializaron por separado para eliminar el Imidazol y reducir la concentración de NaCl. Una vez dializadas las fracciones fueron resueltas por duplicado mediante SDS-PAGE, en paralelo con una curva de concentración de Albumina sérica bovina para realizar una cuantificación densitométrica (Ver **Figura 5**). Como resultado se obtuvo una concentración en la fracción de los lavados de 1,38 mg/ml y de 1.31 mg/ml en la de la elusión, y considerando los volúmenes de las fracciones (± 7 ml de los lavados y ± 11 ml de la elusión, se estimó un rendimiento de 1,83 mg/l en la fracción de los lavados y 3,04 mg/l en la elusión, con un rendimiento aproximado 4,87 mg de antígeno p24 purificado por litro de cultivo.

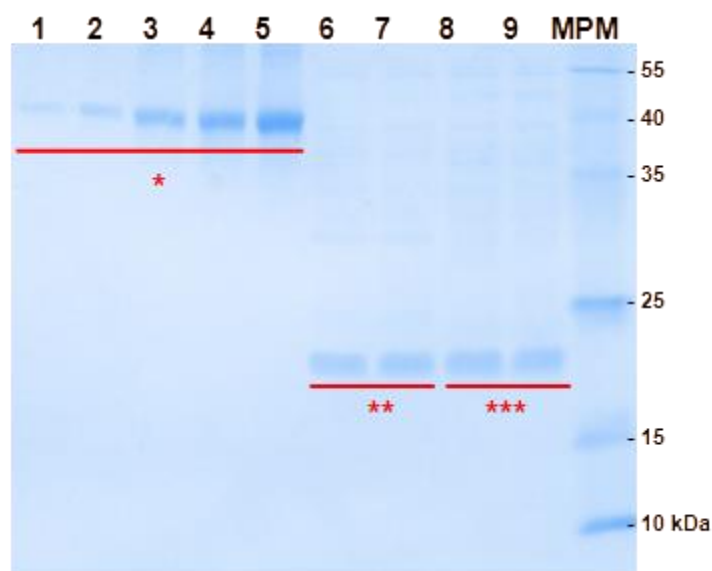


Figura 5: SDS-PAGE de las fracciones proteicas obtenidas de la purificación IMAC. Carriles 1, 2, 3, 4 y 5, curva de concentración Albúmina sérica bovina; carriles 6 y 7, fracción de los lavados; carriles 8 y 9, fracción proteica de la elusión; y carril MPM, marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Cat. no.: 26616).

Los antígenos de ambas fracciones fueron empleadas para la sensibilización de una placa de ELISA y evaluar el reconocimiento de anticuerpos presentes en muestras sueros de bovinos previamente definidos como seropositivos mediante un ensayo de ELISA indirecto comercial. Como se muestra en la **Figura 6**, los valores de densidad óptica de los sueros son superiores a los valores obtenidos en los pocillos sin muestras de sueros (Blancos), lo cual indica un reconocimiento de los antígenos obtenidos de ambas fracciones.

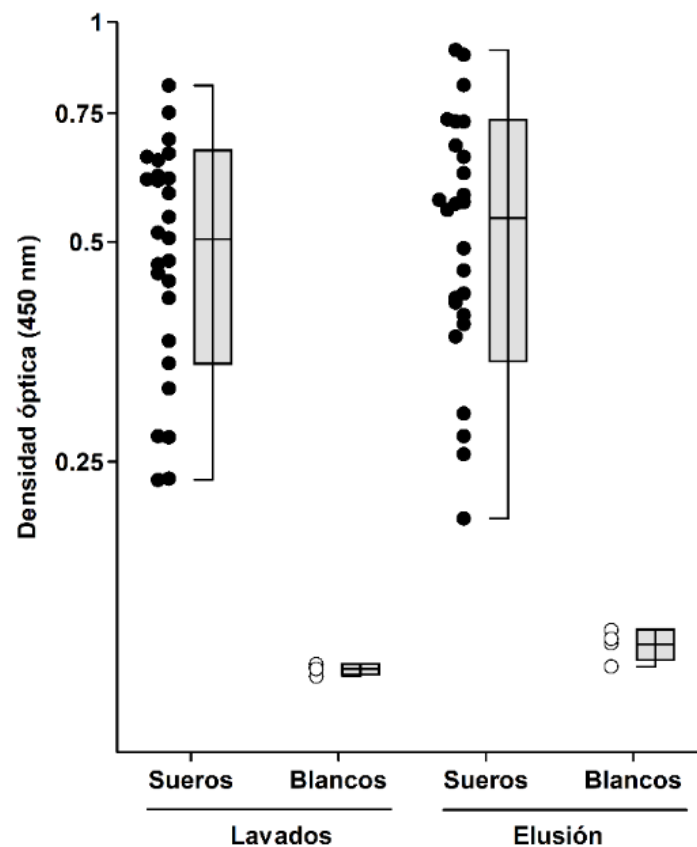


Figura 6: ELISA indirecto con el antígeno recombinante p24 del BoLV. Valores de densidad óptica obtenidos de N muestras bovinos seropositivos al BoLV con el antígeno p24 obtenido en la fracción de los lavados y de la elusión. Los valores de densidad óptica obtenidos con el antígeno de ambas fracciones no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), al contrastarse mediante una Prueba T con muestras no independientes.

8. Discusión

Las pruebas diagnósticas recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) para la identificación de animales afectados por LVB son los ensayos de ELISA indirecto y PCR (OIE, 2011), la primera prueba permite la detección de anticuerpos específicos contra las proteínas p24 ubicada en la cápside del Retrovirus, envolviendo al ARN genómico viral y la glicoproteína gp51 que se encuentra en la envoltura, lo cual permite que sean empleadas de manera individual o en forma simultánea en el inmunoensayo para muestras de suero sanguíneo y lácteo.

En el Ecuador la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD) permite que la prueba oficial utilizada como método diagnóstico de la LVB sea por medio de la técnica de ELISA indirecto (AGROCALIDAD, 2021), sin embargo, en los *kits* que se importan en Latinoamérica únicamente detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51. En la presente investigación con los resultados obtenidos se evidencia que se ha logrado producir la proteína recombinante p24 del BoLV en forma pura en un sistema de expresión bacteriano basado en *E. coli*, este antígeno recombinante podrá ser empleado para el desarrollo de una herramienta inmunodiagnóstica, generando con ello una alternativa diferente a la comercial para el diagnóstico de la LVB en animales sospechosos o infectados. Adicionalmente, esto permitirá generar una base investigativa para el desarrollo de una prueba efectiva de carácter nacional, que pueda estar disponible y accesible para nuestro medio ayudando así a la toma de decisiones en el manejo sanitario de la LVB.

Larsen y colaboradores lograron una producción la proteína recombinante p24 del BoLV con un rendimiento de 5,6 mg/l de cultivo (Larsen *et al.*, 2017). En el caso de esta investigación se logró producir la proteína con un rendimiento de $\pm 4,87$ mg/l, sin embargo, la proteína fue recuperada en dos fracciones, en parte de los lavados de la resina (1,83 mg/l) y en la fracción de la elución: (3,04 mg/l); es importante señalar que en la literatura reportada referente a este tema no se ha reportado la recuperación la proteína recombinante p24 en las fracciones de los lavados, se menciona su recuperación únicamente en la elución (Larsen *et al.*, 2017). Una razón por lo que la proteína recombinante p24 se haya liberado en los lavados, consiste a la saturación en los puntos de interacción del *tag* de Histidinas de la proteína con el Níquel inmovilizado en la resina, a pesar de que según el protocolo empleado menciona que el sistema de purificación IMAC está diseñado para que la proteína que se intenta recuperar se liberada en la elución y no en los lavados. Adicionalmente, se puede presumir también, que esta falla se debió a que la solución donde se encontraba la proteína haya disminuido la capacidad de interacción de ésta con la resina, al favorecer una estructura terciaria de la proteína p24 que reduce la afinidad del *tag* por el Níquel.

7. Conclusiones

Se obtuvo el plásmido recombinante pET15b-p24BoLV mediante la clonación de la secuencia codificante del antígeno p24, amplificada mediante PCR con los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia reportada en el GenBank (ID: LC682198.1).

Fue posible obtener un rendimiento total estimado de 4,87 mg/l del antígeno p24 purificado mediante IMAC a partir de la fracción soluble de la biomasa bacteriana inducida en la cepa recombinante Rosetta 2 (DE3): pET15b-p24BoLV.

Mediante ELISA indirecto *in-house* (casero) se evidenció el reconocimiento del antígeno p24 obtenido, por los anticuerpos presentes en sueros de animales previamente definidos como seropositivos con un ensayo de ELISA indirecto comercial.

8. Recomendaciones

Optimizar el proceso de producción del antígeno recombinante, en particular las etapas de cultivo, inducción y purificación IMAC; en este último paso es importante favorecer la obtención de la proteína recombinante p24 en forma pura en la fracción de la elusión y que no se esté eluyendo en las fracciones de los lavados.

Evaluar el uso de otros reactivos o protocolos para optimizar el ensayo de ELISA indirecto, y validar con mayor número de sueros de animales definidos como infectados con ensayos diagnósticos directos, como la PCR o seropositivos con el uso de ensayos de ELISA indirecto comercial, en paralelo con sueros de animales afectados por el BoLV.

Sugerir al ente regulador encargado (AGROCALIDAD) que en convenio con Universidades u otras instituciones afines hagan un levantamiento de datos a nivel del país para obtener registros de dicha enfermedad y a su vez se haga una evaluación de las pérdidas que la presencia de LVB genera al sector agropecuario.

9. Referencias

- Abdalla, E.A., Rosa, G.J.M., Weigel, K.A., & Byrem, T. (2013). Genetic analysis of leukosis incidence in United States Holstein and Jersey populations. *J Dairy Sci*, 96(9), 6022–6029. DOI: 10.3168/jds.2013-6732
- AGROCALIDAD. (2021). Dirección de diagnóstico animal laboratorio de virología (p. 1). https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/02/DDA_Virolog%C2%A1a-logo-2020.docx.pdf
- AGROCALIDAD. (2022). Enfermedades, infecciones e infestaciones de animales determinadas como de notificación o declaración obligatoria en el ECUADOR. (pp. 1–6). https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2022/10/anexo_1_cat%C3%A1logo_de_enfermedades_aprobado_21-09-2022.pdf
- Baltzell, K. A., Shen, H. M., Krishnamurthy, S., Sison, J. D., Nuovo, G. J., & Buehring, G. C. (2018). Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with Human papillomavirus: Case- control study of women in Texas. *Cancer*, 124(7), 1342–1349. DOI: 10.1002/cncr.31169
- Barez, P.-Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutiérrez, G., Hamaidia, M., Jacques, J.-R., Perike, S., Neelature Sriramareddy, S., Renotte, N., Staumont, B., Reichert, M., Trono, K., & Willems, L. (2015). Recent advances in BLV research. *Viruses*, 7(11), 6080–6088. DOI: 10.3390/v7112929
- Barlett, P.C., Ruggiero, V., Hutchinson, H., Droscha, C., Norby, B., Sporer, K., & Taxis, T. (2020). Current developments in the epidemiology and control of Enzootic bovine leukosis as caused by Bovine leukemia virus. *Pathogens*, 9(12), 1058. DOI: 10.3390/pathogens9121058
- Bartlett, P.C., Norby, B., Byrem, T. M., Parmelee, A., Ledergerber, J. T., & Erskine, R. J. (2013). Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci*, 96(3), 1591–1597. DOI: 10.3168/jds.2012-5930
- Bartlett, P.C., Sordillo, L.M., Byrem, T.M., Norby, B., Grooms, D.L., Swenson, C.L., Zalucha, J., & Erskine, R.J. (2014). Options for the control of Bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 244(8), 914–922. DOI: 10.2460/javma.244.8.914
- Benavides, B., & Laverde-Trujillo, L.M. (2012). Virus de Leucosis bovina: Un enemigo silencioso. *Journal of Agriculture and Animal Sciences*, 1(1), 52–61
- Benitez, O.J., LaDronka, R.M., Norby, B., Grooms, D.L., & Bartlett, P.C. (2022). The effect of Bovine leukemia virus on dairy cow longevity. *JDS Communications*, 3(3), 185–188. DOI: 10.3168/jdsc.2021-0187

- Boris-Lawrie, K., Altanerova, V., Altaner, C., Kucerova, L., & Temin, H. M. (1997). *In vivo* study of genetically simplified Bovine leukemia virus derivatives that lack Tax and Rex. *J Virol*, 71(2), 1514–1520. DOI: 10.1128/jvi.71.2.1514-1520.1997
- Burny, A., Bex, F., Chantrenng, H., Cleuter, Y., Dekegel, D., Ghysdael, J., Kettmann, R., Leclercq, M., Leunen, J., Mammerickx, M., & Portetelle, D. (1978). Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Adv Cancer Res*, 28, 251-311. DOI: 10.1016/s0065-230x(08)60649-1
- Burny, A., Bruck, C., Cleuter, Y., Couez, D., Deschamps, J., Gregoire, D., Ghysdael, J., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, and D., & Burny, (1985). Bovine leukaemia virus and Enzootic bovine leukosis. *Onderstepoort J Vet Res*, 52(3), 133-144
- Burridge, M.J. (1981). The zoonotic potential of Bovine leukemia virus. *Vet Res Commun*, 5(2), 117–126. DOI: 10.1007/BF02214976
- Díaz-Díaz, C.M. (2003). Manual de enfermedades infecciosas en el ganado bovino de la zona central del Litoral ecuatoriano. INIAP, <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1625>
- Da, Y., Shanks, R. D., Stewart, J. A., & Lewin, H. A. (1993). Milk and fat yields decline in Bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(14), 6538–6541. DOI: 10.1073/pnas.90.14.6538
- De Giuseppe, A., Feliziani, F., Rutili, D., & De Mia, G.M. (2004). Expression of the Bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant Baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(1), 147–151. DOI: 10.1128/CDLI.11.1.147-151.2004
- Dolz, G., Huijsen, F., Jiménez, C., & Rodríguez, L.L. (2015). Evaluation of a voluntary control program for the detection of Bovine leukemia virus antibodies based on agar gel immunodiffusion test in dairy farms in Costa Rica. *Open J Vet Med*, 05(12), 229–233. DOI: 10.4236/ojvm.2015.512031
- Esteban, E.N., Poli, M., Poiesz, B., Ceriani, C., Dube, S., Gutierrez, S., Dolcini, G.L., Gagliardi, R., Pérez, S., Lützelshwab, C.M., Feldman, L., & Juliarena, M. (2009). Chapter 6. Bovine leukemia virus (BLV), proposed control and eradication programs by marker assisted breeding of genetically resistant cattle. En: Animal genetics, Rechi, L.J.(Editor). Nova Science Publishers, Inc.
- Felmer, R., Zúñiga, J., & Recabal, M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del Virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch Med Vet*, 38(2), 137-141. DOI: 10.4067/S0301-732X2006000200007

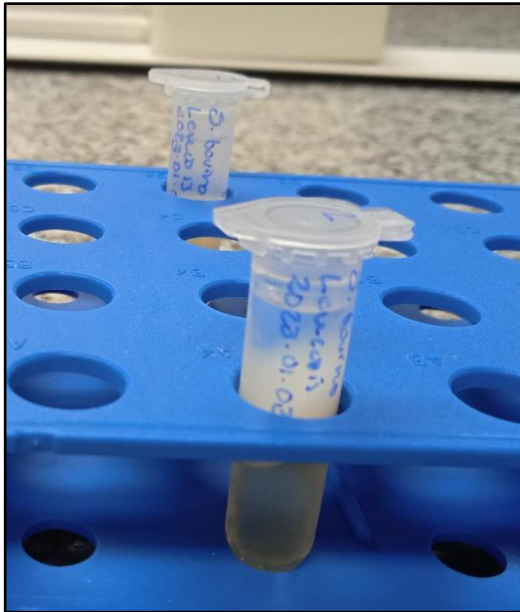
- Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A.-B., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettmann, R., & Willems, L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by Bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4(1), 18. DOI: 10.1186/1742-4690-4-18
- Gutiérrez, G. (2010). Estudio de la dinámica de la infección perinatal con BLV en un rodeo de tambo de alta prevalencia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n4809_Gutierrez
- Gutiérrez, G., Rodríguez, S., De Brogniez, A., Gillet, N., Golime, R., Burny, A., Jaworski, J.-P., Alvarez, I., Vagnoni, L., Trono, K., & Willems, L. (2014). Vaccination against δ -Retroviruses: The Bovine leukemia virus paradigm. *Viruses*, 6(6), 2416–2427. DOI: 10.3390/v6062416
- Gutiérrez, S.E., Lützelshwab, C.M., Barrios, C.N., & Juliarena, M.A. (2020). Leucosis bovina : Una visión actualizada Bovine leukosis : An updated review. *Rev Inv Vet Perú*, 31(3), 1–28. DOI: 10.2460/ajvr.68.11.1220
- Johnston, E.R., Albritton, L.M., & Radke, K. (2002). Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of Bovine leukemia virus surface protein. *J.Virol*, 76(21), 10861–10872. DOI: 10.1128/JVI.76.21.10861-10872.2002
- Juliarena, M.A., Gutierrez, S.E., & Ceriani, C. (2007). Determination of proviral load in Bovine leukemia virus–infected cattle with and without lymphocytosis. *Am J Vet Res*, 68(11), 1220–1225. DOI: 10.2460/ajvr.68.11.1220
- Kuczewski, A., Orsel, K., Barkema, H. W., Mason, S., Erskine, R., & van der Meer, F. (2021). Invited review: Bovine leukemia virus-Transmission, control, and eradication. *J. Dairy Sci*, 104(6), 6358–6375. DOI:10.3168/jds.2020-18925
- Lairmore, M.D. (2014). Animal models of Bovine leukemia virus and human T-lymphotrophic virus Type-1: Insights in transmission and pathogenesis. *Annu Rev Anim Biosci*, 2(1), 189–208. DOI: 10.1146/annurev-animal-022513-114117
- Larsen, A., Corva, S., Panei, J., Geisler, C., & Mortola, E. (2017). Enzyme-linked immunosorbent assays using the recombinant gp51 and p24 of Bovine leukemia virus for immunodetection of the disease. *Open J Anim Sci*, 7, 241-253. DOI: 10.4236/ojas.2017.73019
- Llames, L., Goyache, J., Domenech, A., Montaña, A.V, Suarez, G., & Gomez-Lucia, E. (2001). Cellular distribution of Bovine leukemia virus proteins gp51SU, Pr72env, and Pr66gag-pro in persistently infected cells. *Virus Res*, 79(1–2), 47–57. DOI: 10.1016/S0168-1702(01)00291-X

- Lv, G., Wang, J., Lian, S., Wang, H., & Wu, R. (2024). The global epidemiology of Bovine leukemia virus: Current trends and future implications. *Animals (Basel)*, 14(2):297. DOI: 10.3390/ani14020297
- Maldonado, J. E., & Pérez, C. C. (2022). Enfermedades infecciosas del ganado bovino diagnosticadas entre 2020 y 2022 en la sierra sur del Ecuador. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 63–65. DOI: 10.53588/alpa.300609
- Manet, G., Guilbert, X., Roux, A., Vuillaume, A., & Parodi, A. L. (1989). Natural mode of horizontal transmission of Bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). *Vet Immunol Immunopathol*, 22(3), 255–263. DOI:10.1016/0165-2427(89)90012-3
- Marawan, M.A., Alouffi, A., El Tokhy, S., Badawy, S., Shirani, I., Dawood, A., Guo, A., Almutairi, MM., Alshammari, FA., & Selim, A. (2021). Bovine leukaemia virus: Current epidemiological circumstance and future prospective. *Viruses*, 13(11), 2167. . DOI: 10.3390/v13112167
- Monge-Rojas, C.R., & Elizondo-Salazar, J.A. (2019). La Leucosis enzoótica bovina: Un asesino silencioso. *Nutrición Animal Tropical*, 13(1), 38–54. DOI: 10.15517/nat.v13i1.37520
- Nikbakht, G., Rabbani, M., Emam, M., & Rezatogfighi, E. (2010). Serological and genomic detection of Bovine leukemia virus in human and cattle samples. *Int J Vet Sci Res*, 4(4), 253–258. DOI: 10.22059/ijvm.2010.22101
- OIE. (2011). Pruebas de diagnóstico prescritas y de sustitución para las enfermedades de la lista de la OIE. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2011/es_chapitre_1.1.3.pdf
- Perino, L.J., Wright, R.E., Hoppe, K.L., & Fulton, R.W. (1990). Bovine leukosis virus transmission with mouthparts from *Tabanus abactor* after interrupted feeding. *Am J Vet Med Res*, 51(8), 1167–1169. DOI: 10.2460/ajvr.1990.51.08.1167
- Jacobs, R.M., Pollari, F.L., McNab W.B. & Jefferson B. (1995). A serological survey of Bovine syncytial virus in Ontario: associations with Bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can J Vet Res*, 59(4), 271–278
- Rola-Łuszczak, M., Pluta, A., Olech, M., Donnik, I., Petropavlovskiy, M., Gerilovych, A., Vinogradova, I., Choudhury, B., & Kuźmak, J. (2013). The molecular characterization of Bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny. *PLoS ONE* 8(3), e58705. DOI: 10.1371/journal.pone.0058705

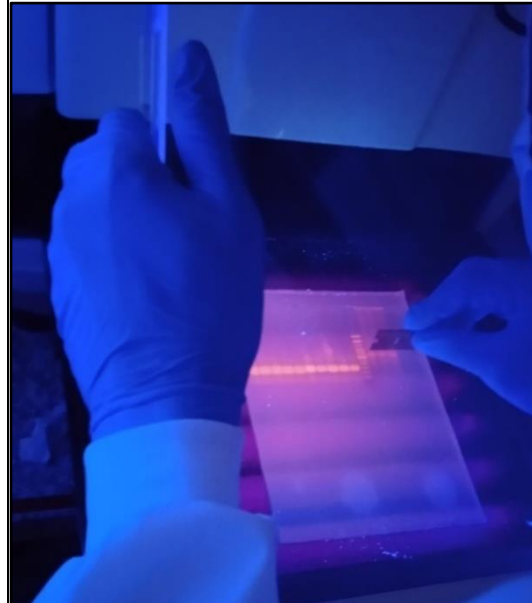
- Salazar-Torres, L., & Buitrago-Mejia, J. (2018). Virus de leucosis bovina (VLB): Una revisión. *Revista Sinergia*, (3), 130-151.
- Sandoval M., R., Delgado C., A., Ruiz G., L., & Ramos C., O. (2015). Determination of the seroprevalence of Bovine leukemia virus in a dairy farm of Lima, Peru. *Rev Investig Vet Perú*, 26(1), 152–158. DOI:10.15381/rivep.v26i1.10919
- Santillana-Amado, R. de M., & Fernandez-Fernandez, F. (2018). Identificación de la gp51 y la p24 para el diagnóstico de Leucosis bovina en ganado lechero de la irrigación de Majes sección C-1 C-2 C-3 provincia de Caylloma región Arequipa 2016. *Universidad Católica de Santa María*, 1–94. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/7344>
- Suárez-Archilla, G., Gutiérrez, G., Camussone, C., Calvino, L., Abdala, A., Alvarez, I., Petersen, M., Franco, L., Destefano, G., Monti, G., Jacques J-R., Joris T., Willems, L., Trono K. (2022). A safe and effective vaccine against Bovine leukemia virus. *Front Immunol*, 10:13:980514. DOI: 10.3389/fimmu.2022.980514
- Toma, B., Eloit, M., & Savey, M. (1990). Animal diseases caused by retroviruses: Enzootic bovine leukosis, Equine infectious anaemia and Caprine arthritis-encephalitis. *Rev Sci Tech*, 9(4), 983–1119. DOI: 10.20506/rst.9.4.531
- Vásconez-Hernández, A., Sandoval-Valencia, P., De La Cueva-Jácome, F., & Byron, P.T. (2017). Seroprevalencia de leucosis enzoótica bovina en animales entre 6 a 24 meses en las provincias de Manabí, Pichincha y Chimborazo - Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 26(2), 131–141. DOI: 10.17163/lgr.n26.2017.11
- Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adriaenssens, E.M., Alfenas-Zerbini, P., Dempsey, D.M., Dutilh, B.E., García, M.L., Curtis-Hendrickson, R., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Lambert, A.J., Łobocka, M., Oksanen, H.M., Orton, R.J., Robertson, D.L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Smith, D.B., Suzuki, N., Van Doorslaer, K., Vandamme, A.M., Varsani, A., & Zerbini, F.M. (2022). Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*, 167(11), 2429-2440. DOI: 10.1007/s00705-022-05516-5
- White, T. L., & Moore, D. A. (2009). Reasons for whole carcass condemnations of cattle in the United States and implications for producer education and veterinary intervention. *J Am Vet Med Assoc*, 235(8), 937–941. DOI: 10.2460/javma.235.8.937
- Zhao, X., & Buehring, G. C. (2007). Natural genetic variations in Bovine leukemia virus envelope gene: Possible effects of selection and escape. *Virology*, 366(1), 150–165. DOI: 10.1016/j.virol.2007.03.058

10. Anexos

Extracción del suero



Corte de la banda con el producto ADN viral



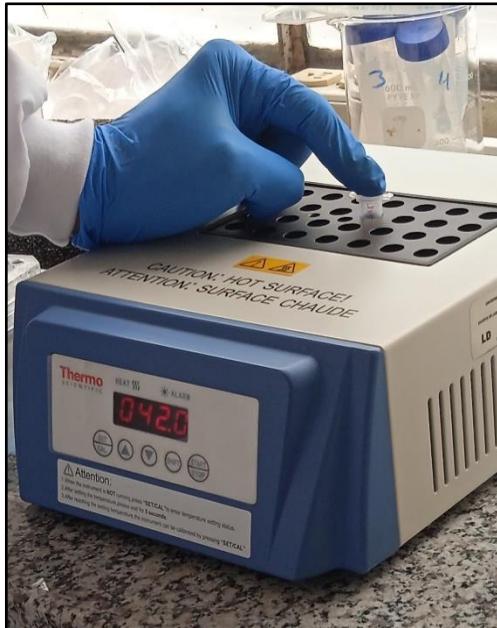
Purificación del Producto



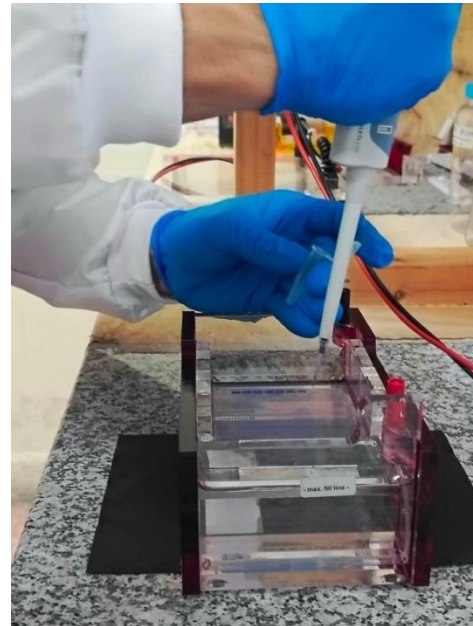
Centrifugación a 14000 r.p.m



Bloque de calentamiento; sometimiento de choque termico a las bacterias



SDS-PAGE, Amplificación del ADN viral



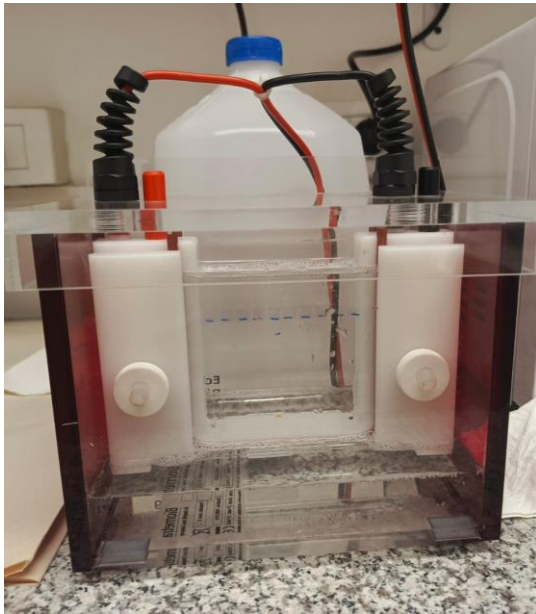
Desnaturalización de la proteína para someter al electroforesis



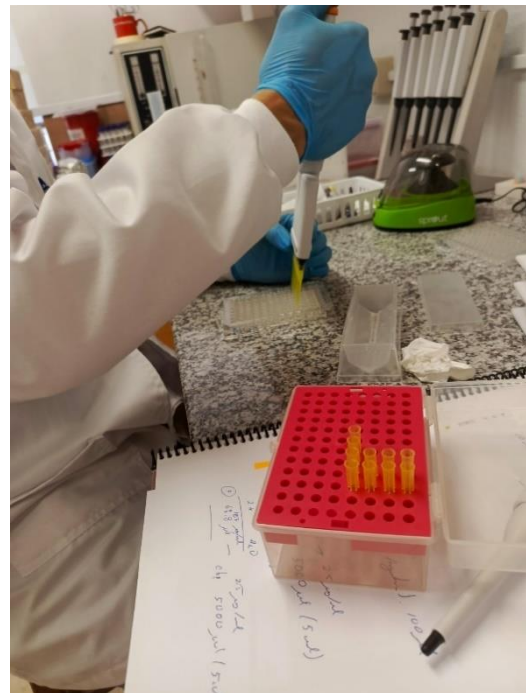
Diálisis de la proteína recombinada



Electroforesis vertical para cuantificación y curva de concentración



Multipipeteo de sueros positivos a LVB



Pepeteo de reactivos para sueros positivos de LVB



Identificación de los sueros positivos para LVB con el cambio de coloración

