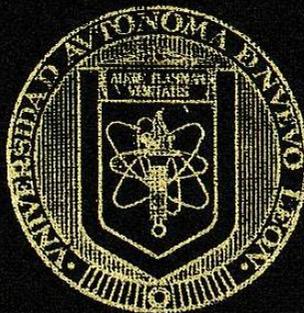


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EFECTO DE FACTORES EN PLASMA Y SUERO  
AUTOLOGOS SOBRE LA EXPRESION DE GENES  
CONSTITUTIVOS Y DE REGULACION DEL VIRUS DE  
LA LEUCOSIS BOVINA EN CELULAS INFECTADAS

QUE EN OPCION AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA

PRESENTA  
MA. ANTONIETA LARA RODRIGUEZ

MONTERREY, N. L.

SEPTIEMBRE - 1997

TM

Z5320

FCB

1997

L37

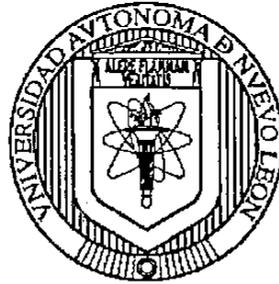


1020121311

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**EFECTO DE FACTORES EN PLASMA Y SUERO  
AUTOLOGOS SOBRE LA EXPRESION DE GENES  
CONSTITUTIVOS Y DE REGULACION DEL VIRUS DE LA  
LEUCOSIS BOVINA EN CELULAS INFECTADAS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA**

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

**MA. ANTONIETA LARA RODRIGUEZ**

**MONTERREY, N.L.**

**SEPTIEMBRE - 1997**

TM  
Z5320  
FCB  
1997  
L37

012 110 00



FONDO TESIS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

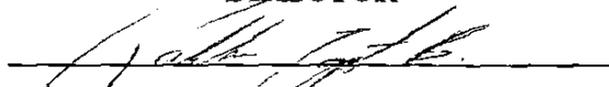


**EFFECTO DE FACTORES EN PLASMA Y SUERO AUTOLOGOS SOBRE LA  
EXPRESION DE GENES CONSTITUTIVOS Y DE REGULACION DEL VIRUS  
DE LA LEUCOSIS BOVINA EN CELULAS INFECTADAS**

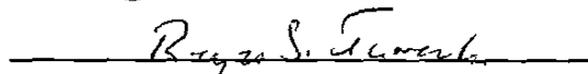
**COMISION DE APROBACION DE TESIS**

  
DRA. LAURA TREJO ÁVILA

**DIRECTOR**

  
M.C. PABLO ZAPATA BENAVIDES

**CO-DIRECTOR**

  
DR. REYES TAMEZ GUERRA

**CO-DIRECTOR**

  
DRA. JULIA VERDE STAR

**DIRECTORA DE DIV. DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**MONTERREY, N.L.**

**SEPTIEMBRE - 1997**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

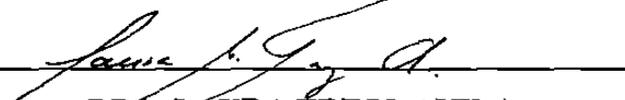
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

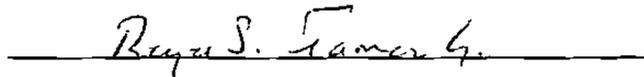


**EFFECTO DE FACTORES EN PLASMA Y SUERO AUTOLOGOS SOBRE LA  
EXPRESION DE GENES CONSTITUTIVOS Y DE REGULACION DEL VIRUS  
DE LA LEUCOSIS BOVINA EN CELULAS INFECTADAS**

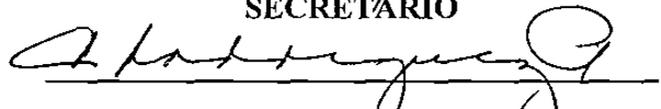
**COMISION DE EXAMEN**

  
DRA. LAURA TREJO AVILA

**PRESIDENTE**

  
DR. REYES TAMEZ GUERRA

**SECRETARIO**

  
DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

**VOCAL**

**MONTERREY, N.L.**

**SEPTIEMBRE -1997**

**DEDICATORIA**

**CON TODO MI AMOR A TI PABLO, ESPOSO  
MIO, TE DEDICO ESTA OBRA  
MARAVILLOSA.**

**A MI MADRE, CARMEN RDZ. VIUDA DE LARA AL SR. MANUEL VALDEZ SAUCEDO.**

**A MIS HERMANOS, JUANY, ARTURO, MARTIN, CONY, MEME Y NENA.**

**A MIS SOBRINOS PRECIOSOS, MAYRA ALEJANDRA, CARLOS Y KEILA.**

**LES DEDICO ESTA OBRA CON TODO MI CARIÑO**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A TI SEÑOR PADRE, AGRADEZCO LA  
OPORTUNIDAD DE VIVIR, PENSAR Y LUCHAR  
PARA Y POR MIS IDEALES. DE LOGRAR  
CULMINAR CON ESTE PROYECTO, Y TE PIDO  
CON TODO EL AMOR Y FE HACIA TI SEÑOR  
PADRE QUE ME SIGAS DANDO LA  
OPORTUNIDAD DE CONTINUAR PARA LOGRAR  
MAS TRIUNFOS PROFESIONALES Y PERSONALES**

**AGRADEZCO PROFUNDAMENTE AL M.C. PABLO  
ZAPATA BENAVIDES EL APOYO BRINDADO PARA  
LA REALIZACION DE ESTA INVESTIGACION, ASI  
COMO POR SU GRAN CONFIANZA EN MI, Y  
DESEO QUE DIOS LO SIGA BENDICIENDO CON  
LAS CUALIDADES QUE POSEE COMO HIJO DE  
DIOS, COMO HOMBRE, COMO PERSONA, AMIGO  
E INVESTIGADOR.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco el apoyo económico brindado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Agradezco al Dr. Reyes S. Tamez Guerra, a la Dra. Cristina Rdz. Padilla y Dra. Laura Trejo Avila por brindarme su apoyo, atención, confianza y paciencia para el desarrollo de mi tesis y con ello mi superación profesional y personal.**

**Agradezco a todo el personal del Laboratorio de Inmunología y Virología por su apoyo brindado.**

**Agradezco a todos mis AMIGOS su confianza y cariño hacía mi.**

## INDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	I
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	VI
<b>LISTA DE TABLAS</b>	VIII
<b>AREA DE TRABAJO</b>	XI
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCION</b>	3
<b>ANTECEDENTES</b>	5
<b>HIPOTESIS</b>	17
<b>OBJETIVOS</b>	18
<b>DIAGRAMA DE FLUJO</b>	19
<b>MATERIAL</b>	
A.- ORIGEN DE LOS REACTIVOS	20
B.- MATERIAL BIOLÓGICO	21
<b>MÉTODOS</b>	
I.- TOMA DE MUESTRA	22
II.- SEROLOGÍA	23
1.- Inmunodifusión	23
2.- Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima	25
3.- Inmunoelctrotransferencia	26
III.- PURIFICACION DE IgG	27
IV.- CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES (CM)	29
V.- CULTIVO DE CELULAS FLK-BLV	30
1.- Propagación	30
2.- Conservación	30
VI.- PRODUCCION Y PURIFICACION DE ANTIGENO Gp-51	32
VII.-EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE PROTEINAS	32
A).- Método de deoxicolato de sodio	32

B).- Método de TRIzol	33
C).- Cuantificación de proteína total por el método de LOWRY	34
VIII.- PRUEBAS MOLECULARES	35
1.- Extracción de DNA	35
2.- Reacción en cadena de la polimerasa ( detección del provirus )	36
3.- Extracción de RNA por el método de Trizol	37
4.- Reacción en cadena de la polimerasa -Transcriptasa reversa ( detección de productos de expresión )	38
a).- Genes constitutivos	38
b).- Región pX	39
<b>RESULTADOS</b>	
<b>I.- SELECCION DE LOS ANIMALES</b>	40
1.- Detección de anticuerpos específicos contra BLV	40
<b>II- DETECCION DEL PROVIRUS EN EL DNA DE CM DE ANIMALES SEROPOSITIVOS A BLV</b>	42
<b>III.- EFECTO DE FACTORES DE PLASMA Y SUERO AUTOLOGOS E IgG EN LA TRANSCRIPCION Y TRADUCCION DE LOS GENES CONSTITUTIVOS Y DE REGULACION pX EN CELULAS FLK- BLV</b>	46
1.- Inmunodetección de proteínas virales	46
2.- Detección de los niveles de expresión de RNAm de los genes constitutivos de BLV por RT-PCR	49
3.- Detección de los niveles de expresión de RNAm de la región pX de BLV por RT-PCR	53
<b>IV.- NIVELES DE EXPRESION DE LOS GENES CONSTITUTIVOS Y DE REGULACION DE BLV EN CM INFECTADAS CULTIVADAS CON FACTORES DE PLASMA Y SUERO AUTOLOGO O IgG</b>	56
1.- Inmunodetección de proteínas virales	56
2.- Detección de los niveles de expresión de RNAm de los genes constitutivos de BLV	57

3.-Detección de los niveles de expresión de RNAm de la región pX de BLV por RT-PCR	64
<b>DISCUSION</b>	68
<b>CONCLUSION</b>	74
<b>PERSPECTIVAS</b>	75
<b>REFERENCIAS</b>	76
<b>APENDICE</b>	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DNA</b>	Acido Desoxiribunucleico
<b>EDTA</b>	Acido Etilén diamino-tetra-acético
<b>RNA</b>	Acido ribonucleico
<b>CO<sub>2</sub></b>	Bióxido de carbono
<b>BrE</b>	Bomuro de Etidio
<b>CM</b>	Células mononucleares
<b>FLK-BLV</b>	Células de riñón de ternera fetal infectadas con BLV
<b>CEHC</b>	Células embrionarias de carnero
<b>CCL88</b>	Células de pulmón de murciélago
<b>NBC-13</b>	Células linfoides neoplásicas infectadas con BLV
<b>dNTP</b>	Deoxinucleotidos trifosfato
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b>OD</b>	Densidad Optica
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio
<b>TRE</b>	Elementos responsables de tax
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
<b>FBP</b>	Factor de plasma que bloquea la expresión de BLV
<b>Gp51</b>	Glicoproteina de 51 kd
<b>Gp30</b>	Glicoproteina de 30 kd
<b>Gp70</b>	Glicoproteina de 70 kd
<b>g</b>	Gramos

<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>h</b>	Horas
<b>IA</b>	Inmunoadherencia
<b>IDAG</b>	Inmunodifusión en agar gel
<b>IET</b>	Inmunoelectrotransferencia
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>LP</b>	Linfocitosis persistente
<b>l</b>	Litros
<b>LTR</b>	Long terminal repeat
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>μl</b>	microlitros
<b>μg</b>	microgramos
<b>mA</b>	miliamperes
<b>MEMC</b>	Medio esencial mínimo de crecimiento
<b>MENM</b>	Medio esencial mínimo de mantenimiento
<b>MENF</b>	Medio esencial mínimo de congelación
<b>RPMI</b>	Medio RPMI 1640
<b>MN</b>	Membrana de nitrocelulosa
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>ng</b>	nanogramos
<b>NV</b>	Neutralización viral
<b>NNP</b>	N-P-Nitrofenil fosfatasa alcalina
<b>N</b>	Normal

<b>ORF</b>	Open reading from, marco de lectura abierta
<b>bp</b>	Pares de Bases
<b>PES</b>	Penicilina-Estreptomicina
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PA</b>	Plasma autólogo
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>p24</b>	Proteína de 23 kd
<b>p15</b>	Proteína de 15 kd
<b>p12</b>	Proteína de 12 kd
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>Rnasa</b>	Ribonucleasa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con productos de la transcriptasa reversa
<b>PBS</b>	Solución balanceada de fosfatos
<b>SA</b>	Suero autólogo
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>TBE</b>	Solución balanceada Tris-boratos
<b>TBS</b>	Solución balanceada de tris
<b>GAG</b>	Secuencia génica de BLV que codifica las proteínas del core
<b>ENV</b>	Secuencia génica de BLV que codifica las proteínas de envoltura

<b>POL</b>	Secuencia génica de BLV que codifica la proteína transcriptasa reversa
<b>Región pX</b>	Secuencia génica de BLV que codifica las proteínas transactivadoras tax y rex
<b>TE</b>	Solución balanceada Tris-EDTA
<b>TS</b>	Solución balanceada tris-salina
<b>RT</b>	Transcriptasa Reversa
<b>Taq</b>	Thermophilus acuático
<b>Tris</b>	Tris-hidroxi-metil aminometano
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>BLV</b>	Virus de la leucosis bovina
<b>HIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>HTLV-I/II</b>	Virus linfotrópico de células T de humano
<b>STLV</b>	Virus linfotrópico de células T de simio
<b>V</b>	Volts

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1.- Estructura del virus de la leucosis bovina.	8
2.- Mapa genético del virus de la leucosis bovina.	9
3.- Diagrama de flujo.	19
4- Patrón de pozos en la inmunodifusión en agar gel.	24
5.- Purificación de IgG bovina.	28
6.-Células mononucleares de un animal infectado con BLV.	29
7.- Células FLK-BLV.	31
8.- Patrón electroforético del DNA de 5 animales probados.	36
9- Inmunoelectrotransferencia para detección de anticuerpos contra BLV de los animales seropositivos por IDAG.	41
10.- Prueba de PCR para la detección de genes de BLV con dos concentraciones de MgCl <sub>2</sub> .	43
11.- PCR para el gen gag de BLV de los animales probados por serología.	44
12.- Inmunoelectrotransferencia de proteínas virales de células FLK-BLV con suero policlonal anti-BLV cultivadas con diferentes tratamientos.	48
13.- RT-PCR de los RNAm de GAG, POL y ENV de BLV en la línea celular FLK-BLV cultivada con diferentes tratamientos.	50
14.- Rearreglo detallado. RT-PCR de los RNAm de GAG, POL y ENV de BLV en la línea celular FLK-BLV cultivada con diferentes tratamientos.	51

15.- Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR de los genes constitutivos de BLV en la línea celular FLK-BLV.	52
16.- RT-PCR del RNAm de la región pX de BLV en células FLK-BLV cultivadas con diferentes tratamientos.	54
17.- Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR del gen regulador pX en células FLK-BLV.	55
18.- Inmunoelectrotransferencia de proteínas virales de CM de las vacas Nos. 8 y 9 con suero policlonal anti-BLV cultivadas con diferentes tratamientos.	57
19.- RT-PCR de genes constitutivos de BLV en CM infectadas de la vaca No. 8 cultivadas con diferentes tratamientos.	58
20.- Expresión de genes constitutivos de BLV en CM infectadas de la vaca No.8 cultivadas con diferentes tratamientos.	59
21.- Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR de los genes constitutivos de BLV de CM de la vaca No. 8.	60
22.- RT-PCR de los genes constitutivos de BLV de CM infectadas de la vaca No. 9 cultivados con diferentes tratamientos.	62
23.- Rearreglo detallado. Expresión de genes constitutivos de BLV de CM infectadas de la vaca No. 9 cultivados con diferentes tratamientos.	62

24.- Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR de los genes constitutivos de BLV de CM de la vaca No. 9.	63
25.- RT-PCR de la región pX de BLV en CM infectada de las vacas Nos. 8 y 9 cultivadas con diferentes tratamientos.	65
26.- Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR de la región pX en CM de las vacas No. 8 y 9.	65

## LISTA DE TABLAS

TABLAS	PAGINA
1.- Curva del estándar	34
2.- Características de los primers	39
3.- Reactividad a las pruebas serológicas para la selección de los animales	45
4.- Expresión de genes constitutivos y de regulación del BLV en la línea celular FLK-BLV	66
5.- Expresión de los genes constitutivos y de regulación del BLV en linfocitos infectados	67
6.- Expresión de la región pX de BLV en la línea celular FLK-BLV y en CM infectadas	67

## **AREA DE TRABAJO**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología y Microbiología, en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la Dirección de la Dra. Laura Trejo Avila, Dr. Reyes Tamez Guerra y M.C. Pablo Zapata Benavides.

## RESUMEN

En los últimos años se han realizado estudios moleculares para lograr una mejor comprensión de los mecanismos de expresión génica y de infección de los retrovirus humanos HIV y HTLV-I/II ( virus de la inmunodeficiencia humana y linfotrópico de células T de humano ). El virus de la leucosis bovina (BLV) debido a su gran semejanza con los retrovirus humanos es un excelente modelo, tanto para estudios clínicos y patológicos de la infección como para estudios basados en el conocimiento de la expresión génica y de los factores que regulan la expresión y que pueden estar involucrados en los muy prolongados períodos de latencia viral. En el organismo infectado por retrovirus se producen factores intracelulares y extracelulares que inducen, reducen o inhiben la expresión de los genes virales. La expresión de BLV “in vivo” es bloqueada aparentemente a nivel transcripcional por factores proteicos que reducen los niveles de expresión del gen estructural GAG y están presentes únicamente en el plasma de animales seropositivos. Por otra parte se ha encontrado un factor en suero ( probablemente IgG ) de animales seropositivos que estimula la expresión del transcrito del gen GAG viral. En este trabajo nuestro propósito fue conocer el efecto “in vitro” de estos factores del plasma y del suero sobre la expresión tanto de genes constitutivos de BLV como sobre la expresión de los genes virales de regulación, a nivel de transcripción y de traducción. Con este propósito probamos 10 animales de un hato de alta seroprevalencia mediante las pruebas serológicas IDAG ( inmunodifusión en agar gel ), IET ( inmunolectrotransferencia ) y ELISA ( Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima ) y la prueba de PCR ( Reacción

en cadena de la polimerasa ), se seleccionaron 2 animales positivos a todas las pruebas anteriores. Se cultivaron las células mononucleares (CM) de los animales seleccionados y las células FLK-BLV ( células de riñón de ternera fetal infectadas con BLV ) en presencia de plasma y suero autólogos, IgG de animales seropositivos y suero fetal bovino como control. Se observó por IET una disminución de los niveles de proteínas estructurales en presencia de plasma y un incremento en presencia de suero o de IgG tanto en CM como en células FLK-BLV. Por otro lado se observó por RT-PCR ( reacción de la polimerasa en cadena con productos de la transcriptasa reversa ) una disminución en la expresión de transcritos de los genes constitutivos POL, ENV y GAG en presencia de plasma y un aumento en la expresión con suero autólogo. Con respecto al gen regulador pX se observó que en presencia de plasma existe una reducción de los niveles de transcritos aparentemente más evidente que la reducción de los transcritos de los genes constitutivos ( en algunos casos a niveles no detectables ) tanto en CM de animales infectados como en la línea celular FLK-BLV. Resumiendo los resultados obtenidos se observa una reducción en los niveles de transcritos tanto de los genes constitutivos como del gen regulador y una reducción en los niveles de proteínas estructurales del virus “Gp51 y p24” debido a factores presentes en el plasma autólogo. Por otro lado encontramos que el suero autólogo es un factor que esta actuando de manera contraria a los factores del plasma ya que incrementa la expresión de los genes constitutivos y reguladores en CM y células FLK-BLV, sin embargo no se observó ningún incremento en la transcripción de los genes virales por IgG.

## INTRODUCCION

En los últimos años se han realizado estudios moleculares para conocer y comprender los mecanismos de expresión génica y patogénesis de los retrovirus como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), el Virus Linfotrópico de células T de Humano (HTLV-I/II) y el Virus de la Leucosis Bovina (BLV). Estos son retrovirus que se replican en células del sistema inmune y se integran al azar en el genoma del hospedero produciendo un largo período de latencia. No poseen oncogenes pero sus productos son capaces de conducir a una transformación celular después de un período de latencia.

El virus de la leucosis bovina tiene numerosas características de estructura, expresión génica y patología similares a los retrovirus humanos y es un buen modelo de estudio para lograr el entendimiento de los mecanismos de regulación de la expresión viral y la activación de genes involucrados en los mecanismos de transformación celular.

El virus de la leucosis bovina, un retrovirus tipo C es el agente etiológico de la leucosis bovina enzoótica, una enfermedad linfoproliferativa persistente, el ganado lechero es el más afectado principalmente de 4 a 8 años de edad, afecta en menor grado al ganado productor de carne, este virus causa la neoplasia más común y maligna del ganado bovino “El linfoma de células B” el cual se presenta después de un largo período latente.

Existen factores en el huésped que suprimen y/o estimulan la transcripción de los retrovirus, estos pudieran jugar un papel importante en los mecanismos involucrados en los largos períodos de latencia del virus. Los estudios realizados sobre la supresión y/o estimulación de los niveles de expresión génica del virus ( transcripción y traducción ) nos llevan a comprender los fenómenos que ocurren cuando el virus se mantiene latente o bien cuando termina el período de latencia viral en el organismo infectado.

Estudios realizados han llevado al descubrimiento de un factor proteico presente en plasma de animales infectados con el BLV el cual inhibe la expresión del gen GAG viral y en humanos se ha encontrado que el plasma de pacientes infectados con HTLV-I tiene la capacidad de inhibir la expresión del virus en cultivos de linfocitos naturalmente infectados.

Por otro lado se ha reportado que la IgG de ganado seropositivo a BLV estimula la expresión del virus.

En el presente estudio se observó el efecto de los factores del plasma y suero autólogos y de la IgG sobre la expresión de los genes constitutivos ( Gag, Env, Pol ) y reguladores ( pX ) del BLV en CM infectadas con BLV y en la línea celular FLK-BLV.

## ANTECEDENTES

La leucosis bovina enzoótica es una enfermedad linfoproliferativa persistente causada por un retrovirus tipo C, el virus de la leucosis bovina (BLV) ( 42, 57 ), el cual afecta principalmente al ganado lechero de 4 a 8 años de edad y en menor grado al ganado productor de carne (3 ) capaz de causar la neoplasia más común y maligna del ganado bovino “El linfosarcoma” (20), en forma experimental se han infectado a ovejas, cabras y conejos.

De todos los animales infectados únicamente una pequeña proporción ( menos del 10 % ) desarrolla linfosarcoma y el resto se mantienen como portadores asintomáticos o desarrollan una linfocitosis persistente ( LP ) que puede ser considerada como una etapa preleucémica que da inicio a una respuesta linfoproliferativa, sin embargo, muchos animales con LP nunca desarrollan neoplasias, aún así la LP es considerada como una respuesta benigna de la infección (43 ).

Se han reconocido 4 tipos de linfosarcoma bovino de acuerdo a las características clínicas y patológicas, la más común es la forma adulta relacionada con el agente etiológico viral que se desarrolla en el ganado de 4 a 8 años de edad manifestando inflamación de los ganglios y ocasionalmente infiltración linfoide en corazón, riñones y útero.

El virus de la leucosis bovina y los virus linfotrópicos T humanos ( HTLV-I/II ) y de simio ( STLV ) comparten numerosas características de infección, patología, así como una estructura genética similar y una

estrategia común de expresión génica, además poseen el gen regulador pX como una característica distintiva de los otros retrovirus, se integran fortuitamente en el genoma del hospedero, no poseen oncogenes pero sus productos por sí mismos conducen a malignidad después de un largo período de latencia (26).

## **SEROEPIDEMIOLOGIA**

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en la población de ganado bovino en Estados Unidos, Japón, Gran Bretaña, Venezuela, Italia, Francia y otros (3,11).

En México se han realizado estudios esporádicos sobre la incidencia de la enfermedad. Monroy y colaboradores ( 1985 ) realizaron un estudio seroepidemiológico en los centros experimentales pecuarios en Puebla, Tamaulipas y Oaxaca encontrando una incidencia de 18.34, 54.32 y 2.56 % respectivamente de un total de 445 animales (37). En otro estudio de prevalencia en diferentes razas realizado en México se encontró que en la raza pardo suiza había 17.8 %; en la indubrasil, 14.28 % y la Brahman y Suiza, 0.0 % de un total de 193 animales (27). En el noreste de la República Mexicana hemos encontrado una prevalencia de 16.30 % en ganado lechero mayor de 2 años y 1.95 % en ganado de carne mayor de 2 años, sin embargo hemos encontrado hatos lecheros con una seroprevalencia de hasta 69.84 % ( 58 ). Estos datos indican una prevalencia similar a la de otros países tanto en ganado lechero como en ganado de carne.

## **TRANSMISION**

El virus de la leucosis bovina se transmite a través de linfocitos infectados de un animal a otro. Pruebas epidemiológicas señalan que la transmisión es tanto vertical como horizontal. En la transmisión horizontal el virus puede transmitirse de un bovino infectado a otro a través de fomites (12), insectos hematófagos ( 40 ), manejo del hato y contacto directo (19 ).

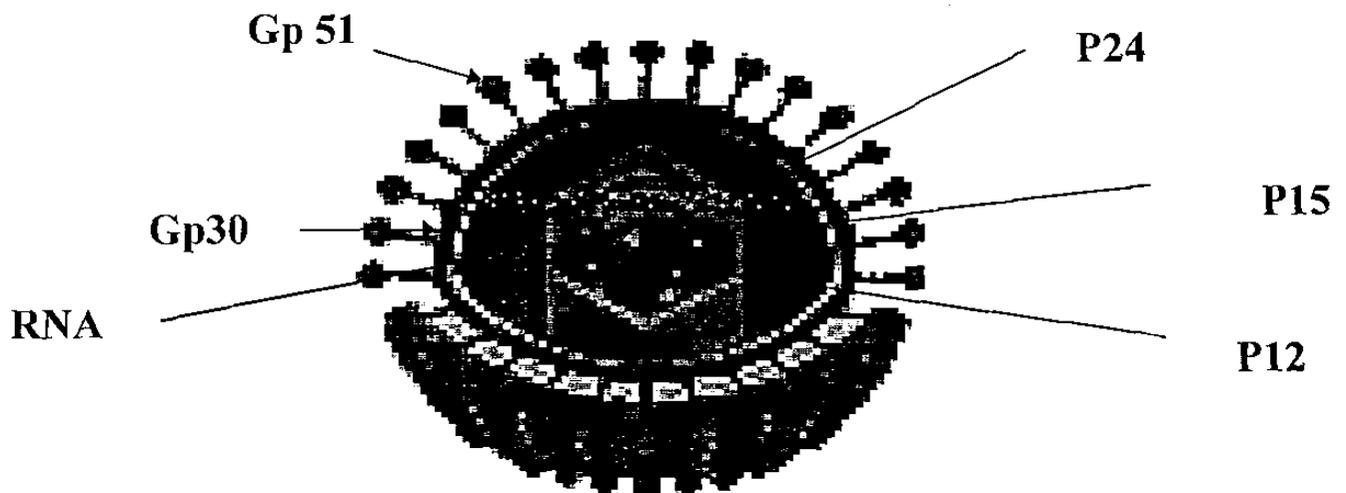
## **DIAGNOSTICO**

El diagnóstico es establecido mediante exámenes clínicos, hematológicos, necrópsicos y por pruebas serológicas como el radioinmunoensayo (RIA), inmunodifusión en agar gel (IDAG), inmunoadherencia (IA) y neutralización viral (NV) basándose en la presencia ya sea de anticuerpos contra el virus o de antígenos virales (32,34). Los métodos de diagnóstico molecular han representado una herramienta indispensable en el estudio de la Biología Molecular, entre estos métodos se encuentra southern blot, northern blot, hibridación in situ y reacción en cadena de la polimerasa con sus respectivas variantes (35,50). La inmunodifusión en gelosa continúa siendo la técnica oficial de detección y de control de la leucosis enzoótica bovina, establecida por el Consejo de la Comunidad Europea a partir de Noviembre de 1980. Los otros métodos serológicos mencionados presentan diversas inconveniencias como son el requerimiento de antígenos altamente purificados, equipo muy costoso como en el caso de radioinmunoensayo, dificultad en la interpretación en el caso de la inmunofluorescencia, o tiempo muy prolongado para obtener resultados en el caso de la prueba de seroneutralización (32).

## ESTRUCTURA GENICA DEL VIRUS

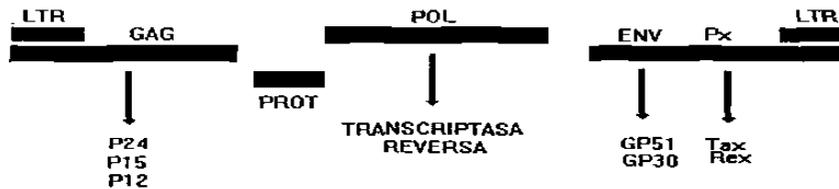
Los retrovirus son virus envueltos con una estructura esférica que contiene dos moléculas idénticas de RNA con polaridad positiva. BLV está compuesto por una bicapa lipídica que contiene 2 glicoproteínas, la proteína externa Gp51 y la proteína transmembranal Gp30 que juegan un papel importante en la infectividad del huésped (46). El “core” está constituido por proteínas altamente básicas como las P24, P15 y P12 (50) y dentro del core se encuentra el RNA genómico y la transcriptasa reversa que tiene un requerimiento absoluto de Mg.

FIGURA 1.- ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA.



El RNA esta constituido por 8,714 nucleótidos que integran los siguientes locus genéticos, 5LTR-gag-prot-pol-env-px-3LTR. Los LTR (Long Terminal Repeat) están constituidos por 530 pb ( pares de bases ) ( 45,46 ). Los LTR estan constituidos por las regiones U3--R--U5 que juegan un papel importante en la integración y replicación de los retrovirus, estos contienen los elementos promotores y “enhancer” que incrementan la eficiencia transcripcional de los genes virales y celulares (9,45) . Probablemente lo que permite la realización de acciones biológicas comunes entre BLV y HTLV es la alta homología ( 50% ) que poseen sus LTR.

**FIGURA 2.- MAPA GENETICO DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA.**



Gen GAG. Es el primer marco de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF), está constituido por 1179 pb que codifican las proteínas internas del core sintetizadas como un solo precursor con un PM de 45 Kd. El orden de las proteínas dentro del precursor está constituido de la siguiente manera: NH - p24-p15-p12-COOH. Las p24 y p15 están constituidas de 215 y 190 aminoácidos respectivamente y son las proteínas que constituyen el core, la p12 es de 69 aminoácidos y se une al ácido nucleico, ésta proteína se caracteriza porque contiene periódicamente residuos de cisteína (42,46).

PROTEASA VIRAL. Es codificada por un segmento de RNA viral localizado entre los genes GAG y POL. Este segmento se extiende del nucleótido 1548 pb al 2132 pb iniciando 49 pb río arriba del gen gag y presenta una alta homología con la proteasa murina (46).

Gen POL. Es el gen que posee el ORF más grande, se extiende desde los nucleótidos 2318 al 4876, codifica el precursor que da origen a la transcriptasa reversa. El precursor es una poliproteína que contiene determinantes de los genes GAG y POL, traslapándose por 500 pb con el gen GAG, éste es un precursor de 95 Kd y da origen a la transcriptasa reversa que es de 70 Kd y a una endonucleasa de 32 Kd. El gen POL es uno de los más conservados entre la familia de los retrovirus. La porción amino de BLV y HTLV-I presentan una homología de 44.6 % y la porción carboxilo 51.8 % (42).

Gen ENV. Es el tercer fragmento de lectura abierta ( ORF ), se extiende del nucleótido 4820 al 6,368 y codifica 515 aminoácidos dando origen a dos proteínas glicosiladas de envoltura ( Gp-51 y Gp-30 ) sintetizadas por una división proteolítica de un polipeptido precursor (gp70), las proteínas son trasladadas a la superficie celular e incorporadas con el resto de las proteínas virales durante el período de gemación. La gp51 es una glicoproteína externa que contiene 8 sitios parcialmente glicosilados, y es detectada tempranamente durante la infección (46). La gp 30 es una glicoproteína transmembranal que contiene dos sitios hidrofóbicos y dos secuencias altamente glicosiladas (46, 55). Se ha encontrado que la variabilidad del gen ENV entre los diferentes aislados de BLV es muy limitada ( menos del 6%) esto es muy similar a lo encontrado en HTLV- I (46).

Gen pX. Está localizado entre el gen ENV y el LTR 3' y contiene 1817 nucleótidos, dentro de esta región están codificados 3 ORF denominados X-I, XII y XIII, en células infectadas se ha identificado un RNAm subgenómico que contiene los ORF X-I y XII traslapados, este RNAm es generado por un doble proceso de maduración en el cual se unen tres regiones genéticas, la primera es de 100 nucleótidos y está ubicada en la región "R" de la terminación 5' LTR, la segunda un exón de 220 pb inmediato a la terminación 5' del gen ENV y la última corresponde a 1360 nucleótidos contenidos en la terminación 3' del RNA genómico; la traducción del RNA subgenómico produce las proteínas p38 ( proteína TAX ) derivada del ORF X-I y p18 ( proteína REX ) originada del X-II; ambas son proteínas nucleares no estructurales y tienen un efecto "in trans" sobre las secuencias reguladoras del BLV (47,48).

PROTEINA TAX es una fosfoproteína nuclear de 38 Kd, es un potente transactivador de los elementos responsables de TAX (TRE), estos elementos se encuentran localizados en los LTR. La proteína regula la iniciación de la transcripción del virus. La función transactivadora de TAX juega el papel central de la transformación celular o leucemogénesis activando genes que regulan el crecimiento celular. TAX es capaz de producir transformación en cultivos primarios en cooperación con RAS y puede ser considerado dentro del subgrupo de oncogenes que causan inmortalización (47,48).

PROTEINA REX es una fosfoproteína nuclear de 18 Kd que actúa postranscripcionalmente para modular los niveles de RNAm de los genes estructurales del virus. La regulación de REX requiere de elementos de acción en cis en la molécula de RNA viral localizados en U3' de los LTR (47,48).

## **INFECCION**

La infección por BLV es caracterizada por linfocitosis y linfoma de las células B, el provirus se integra al DNA de los linfocitos B y produce un largo período latente (42), sin embargo recientemente se ha encontrado en subpoblaciones de linfocitos T (T cooperadores y T citotóxicos/supresores), quizá en ellos se presente un fenómeno similar al que presenta el gen regulador ( pX ) de HTLV-I/II el cual incrementa la actividad de algunas linfocinas (R-IL2) que están involucradas en la regulación de la proliferación linfocítica conduciendo a un proceso leucemogénico (51).

BLV es un virus exógeno, ya que estudios de hibridación han demostrado que las secuencias de DNA viral son encontradas en tejido tumoral y no han sido detectadas en DNA de bovinos normales (9,24).

### **EXPRESION DE GENES VIRALES**

Los estudios de hibridación molecular fracasan para detectar el RNA viral de los linfocitos infectados antes de ser cultivados por lo tanto el virus no es expresado en niveles detectables “in vivo” (50). Sin embargo se han encontrado anticuerpos en niveles razonables en circulación. En infecciones persistentes el virus es recuperado de células mononucleares sanguíneas periféricas después de que han sido cultivadas en un período corto en presencia de ciertos mitógenos ( fitohemaglutinina, concanavalina A o lipopolisacaridos ) que estimulan la producción del virión (4,26).

Las proteínas y partículas virales han sido detectadas de 3 a 6 horas después de iniciado el cultivo celular pero su máxima expresión se obtiene de 24 a 48 horas después. Se ha observado un número muy bajo de células que actúan como centro infeccioso de  $1:1 \times 10^6$  durante la latencia y en cultivo la producción de linfocitos infectados incrementa de 1:2000. El suero es uno de los principales inductores de la transcripción además de ciertos activadores policlonales de las células de la respuesta inmune no solamente incrementando el número de células que contiene transcritos sino también los transcritos virales en cada una de las células (26).

Por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en productos de la transcriptasa inversa ( RT-PCR ) se han observado patrones diferentes de transcripción en BLV en cada uno de los estados de la enfermedad (21,38). El RNA mensajero completo y el gen env son encontrados en animales aleucémicos y disminuyen en animales LP mientras que el RNA del gen TAX/PX se encuentra en altos niveles en los tres estados de la enfermedad por lo que estos resultados sugieren que “in vivo” el genoma de BLV no es reprimido completamente o permanentemente en la transcripción de sus genes estructurales (21). Gupta et al encontraron un factor proteico, no inmunoglobulina ni interferón de 150 Kd denominado “factor del plasma que bloquea a BLV”, que bloquea los niveles de transcripción en BLV y está presente únicamente en plasma y no en suero de animales seropositivos (15,16), es altamente específico ya que se ha observado que no inhibe la expresión de otros virus que causan leucemias como el virus de la leucemia felina y el virus de la leucemia murina de Rausher, este factor ha sido detectado en la mayoría de los animales positivos pero no en los animales seronegativos y no protege contra otros virus bovinos (16). En linfocitos de bovino infectados con BLV cultivados con 100% de plasma autólogo se reprimió la síntesis de la proteína de core “p25” de BLV que es utilizada como indicador de la transcripción por producirse 10 veces más que las otras proteínas virales, el bloqueo de la expresión del RNA viral ha sido demostrado por las pruebas de hibridación molecular específicamente “Dot Blot” (20,21). Sin embargo los mejores resultados son observados cuando se usan concentraciones de 20 a 40 % de plasma en medio esencial mínimo ( MEM ) suplementado con 5 a 10 % de

suero fetal bovino (SFB), centrifugaciones altas han permitido eliminar la posibilidad de que la variabilidad de la actividad bloqueadora fuera una consecuencia de los factores liberados por plaquetas. Recientemente se ha encontrado al factor bloqueador de la expresión en fluido linfático el cual es libre de plaquetas y su actividad bloqueadora es dependiente de la dosis con una máxima actividad entre 30 a 40 % (57).

Además del factor bloqueador en el plasma y fluido linfático de animales infectados se ha encontrado un factor estimulador de la expresión de BLV el cual precipita con sulfato de amonio al 50 %, tiene la capacidad de unirse a la proteína G y a las resinas aniónicas y eluye como una molécula de 160 Kd con una movilidad electroforética semejante a las IgG (57). Se ha observado que la IgG del ganado seronegativo estimula débilmente la expresión del virus, sin embargo con IgG de ganado seropositivo en bajas concentraciones se presenta mucho mayor expresión viral. Se piensa que el factor estimulador de la expresión es una molécula de IgG con actividad anti-BLV, los mecanismos de interacción con el antígeno viral para estimular su expresión aún no han sido determinados (58). El plasma de humanos infectados con HTLV-I/II inhibe fuertemente la expresión de BLV sin embargo la fracción de IgG de plasma de estos pacientes no estimula la expresión de BLV (57). En un estudio realizado con pacientes infectados con HIV en donde se utilizaron bajas concentraciones de IgG se observó un incremento en la replicación viral, aunque este efecto es atribuido por incrementar la penetración del virus, la posibilidad de que estimule la expresión viral no ha sido descartada (52,31).

Se han realizado estudios con retrovirus humanos y se ha encontrado que el plasma de pacientes infectados con HTLV-I tiene la capacidad de inhibir la expresión del virus en cultivos de linfocitos naturalmente infectados (55,57).

Factores similares al factor bloqueador del plasma de bovinos infectados con BLV pueden ser los responsables de mantener un estado latente de HTLV-I y de otros retrovirus “in vivo”. En experimentos preliminares se demostró que el plasma de pacientes infectados con HTLV-I inhibe la expresión “in vitro” del antígeno p19 asociado a HTLV-I (18).

## **HIPOTESIS**

Los factores del plasma y suero autólogos de animales seropositivos a BLV pueden ejercer un efecto de inhibición y/o inducción en los niveles de expresión de los genes constitutivos ( POL, ENV Y GAG ) y de regulación ( pX ) del virus de la leucosis bovina en células infectadas.

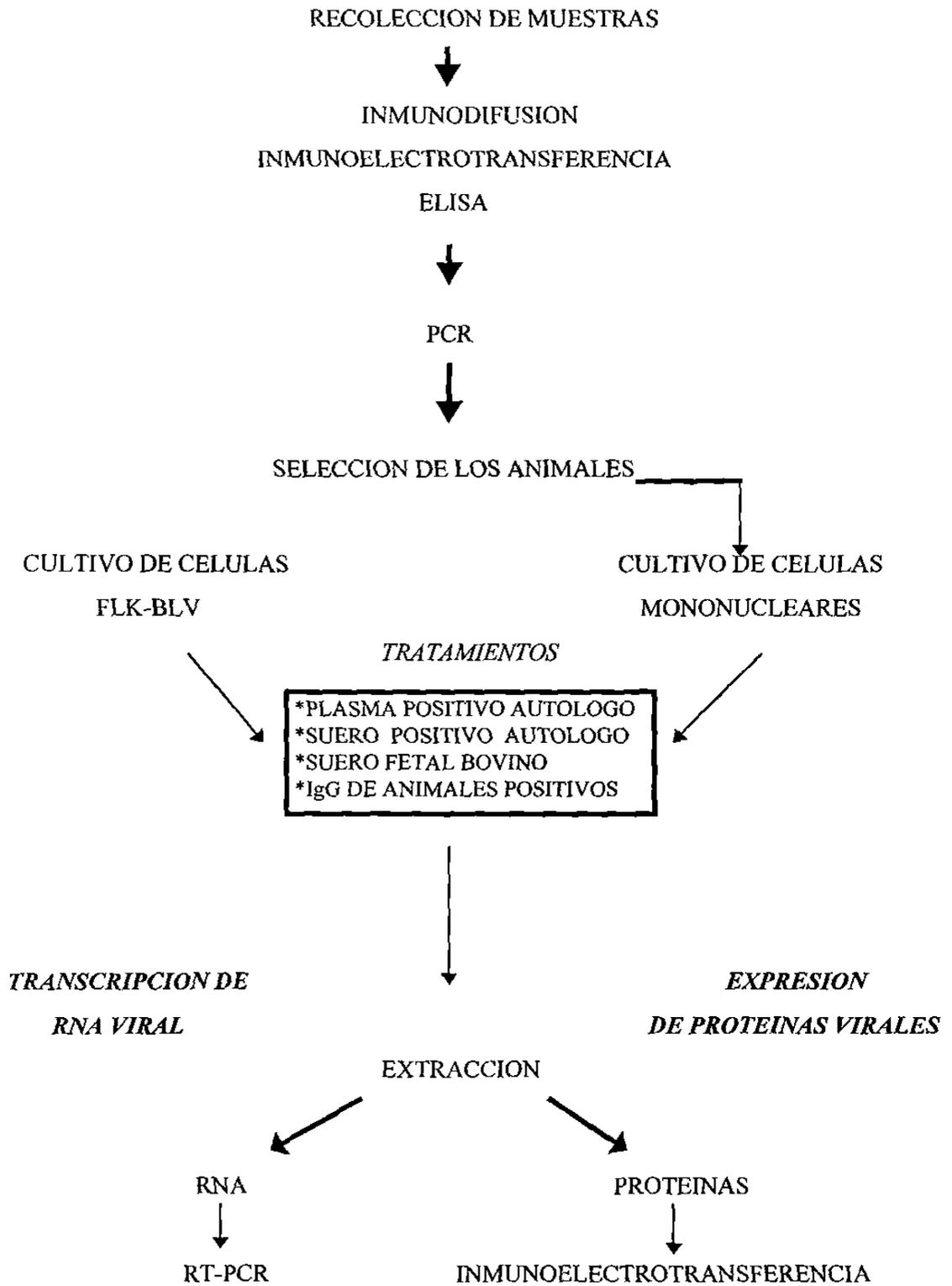
## **OBJETIVOS**

1.- Observar el efecto de los factores del plasma y suero autólogos de animales seropositivos a BLV sobre la transcripción de los genes constitutivos ( POL, ENV, GAG ) y de regulación ( pX ) en células mononucleares infectadas y en la línea celular FLK-BLV.

2.- Observar el efecto de los factores del plasma y suero autólogos de animales seropositivos a BLV sobre la producción de proteínas estructurales del virus en células mononucleares infectadas y en la línea celular FLK-BLV.

**FIGURA No. 3**

**DIAGRAMA DE FLUJO**



## **ORIGEN DE LOS REACTIVOS**

**SIGMA CHEMICAL COMPANY.-** Agarosa, ácido etilen-diamino-tetraacético, azul de coomassie, acrilamida, albúmina de huevo, alfa-D-manosidasa, bicarbonato de sodio, bromuro de etidio, cloruro de sodio, conjugado anti-IgG de bovino-peroxidasa, diaminobenzidina, dimetilsulfoxido, dietilpirocarbonato, duodecil-sulfato de sodio, fenol-folin-ciocalteu, fenol, ficoll-histopaque, glicina, lactoalbúmina, medio esencial mínimo, N-P-Nitrofenil fosfatasa alcalina, NP-40, penicilina, persulfato de amonio, proteinasa K, rojo ponceau, RPMI-1640, sulfato de estreptomicina, sulfato de amonio, tris-HCl, tween-20, , UREA.

**LABORATORIOS PISA, S.A. DE C.V.-**Heparina sódica.

**PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY, S.A.-** Acido acético, Acido clorhidrico, cloroformo, etanol, formaldeído, isopropanol, peróxido de hidrógeno, metanol.

**FARMACIA -** Proteína A sefarosa, sílica proteína A, sefarosa Con A.

**BIOEXPORT.-** Suero fetal bovino.

**GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES.-** Ditríotreitól, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, oligo(dt), RNAsin, solución amortiguadora para transcriptasa reversa, tfl-DNA-polimerasa.

## **MATERIAL BIOLÓGICO**

Las muestras sanguíneas de los animales fueron obtenidas de un hato de alta seroprevalencia al virus de la leucosis bovina ( BLV ) perteneciente al Campo Experimental Canada, Escobedo, N.L. (59).

La línea celular FLK-BLV fue gentilmente donada por el Dr. M.J. Van der Maaten del Laboratorio Nacional de Enfermedad Animal, del Departamento de Agricultura de Ames, Iowa, Estados Unidos.

## **METODOS**

### **I.- TOMA DE MUESTRA**

**1.- Obtención de suero.-** Se sangraron 10 animales de un hato con alta seroprevalencia al virus de la leucosis bovina ( BLV ) de la vena caudal ( 10 ml ), se centrifugó a 1,200 rpm, el suero fue separado y almacenado a - 20°C.

**2.- Obtención de plasma.-** Se sangraron los 10 animales del hato de la vena caudal, se utilizaron tubos vacutainer de 18X100 que contenían heparina sódica, se centrifugaron los tubos a 1,200 rpm, el plasma fue colectado y centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos para eliminar plaquetas, posteriormente fue almacenado a -20 ° C hasta el momento de su uso.

**3.- Obtención de células mononucleares con el método descrito por Boyüm-1968 .-** Para la obtención de CM se sangraron los 2 animales seleccionados del hato por la vena caudal, se utilizaron tubos vacutainer de 18X100 que contenían heparina sódica, se centrifugaron los tubos a 1,200 rpm, se tomó la capa leucocitaria ( aproximadamente 4 ml ) y se transfirió cuidadosamente sobre una capa de 6 ml de FICOLL- HISTOPAQUE- 1077 ( SIGMA DIAGNOSTIC ) contenidos en tubos de ensaye de 18X100, se centrifugó a 3000 RPM por 30 minutos. Posteriormente se tomo la fase de CM y se cultivaron en medio RPMI-1640.

## II.- SEROLOGIA

**1.- Inmunodifusión. Con modificaciones al método descrito por J. Miller y M.J. Vander Maaten 1977 ( 32 ).**

- Se prepararon cajas de 85 mm de diámetro con 8.5 ml de agarosa al 0.8 % en solución amortiguadora de tris HCl 50 mM pH 7.2 con 8.5 % de NaCl ( Cloruro de sodio ), se hicieron pozos con un patrón de distribución que consistió en 1 pozo central y 6 periféricos cada uno con un diámetro de 7 mm y 2 mm de distancia entre uno y otro con una profundidad de aproximadamente 5 mm.

- En el pozo central se colocaron 30 µl de antígeno ( Gp-51 ) y en los pozos numerados 1, 2, 3 y 4 se colocaron 30 µl del suero problema mientras que en los pozos 5 y 6 se colocaron la misma cantidad de los sueros controles.

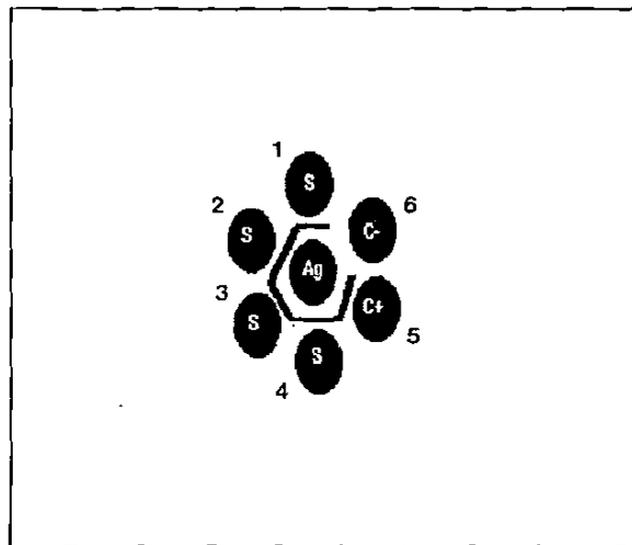
- Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente en una cámara húmeda con 0.1% de formaldehído.

- Las lecturas se realizaron a las 24 y 48 hr después de colocar las muestras.

\*Para incrementar la sensibilidad de la prueba las bandas de precipitación fueron teñidas con azul de coomassie.

- Las cajas se lavaron con solución salina al 9 % durante toda la noche a 4° C, posteriormente con agua bidestilada durante 2 hr y se secaron en papel filtro por 3 hr a 40°C.

- La membrana de agar previamente deshidratada fue teñida con una solución de azul de coomassie a una concentración de 2 mg/ml durante 20 minutos, el exceso de colorante fue removido con una solución de ácido acético, metanol y agua en relación de 1:1:8.



**FIGURA 4 .-** Patrón de pozos en la inmunodifusión en agar gel. En el centro se coloca el antígeno y en la periferia los sueros problemas intercalados por suero control

**2.- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima ( ELISA ). Según método descrito por J. Ban - 1990 ( 1 ).**

**a).- Sensibilización.-** Se agregaron 100  $\mu$ l de la suspensión de proteínas ( 10 $\mu$ g/ml ) a cada pozo de las microplacas de ELISA ( Becton Dickinson Labware) y se dejó adsorber toda la noche a temperatura ambiente, después de este tiempo se eliminó el sobrenadante.

**b).- Bloqueo.-** Se agregó a cada pozo 110 $\mu$ l de la solución bloqueadora ( Tris-HCl +0.15% de Tween-20 a pH 7.2 ), se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, después las placas se lavaron 2 veces con solución de lavado ( Tris-HCl+ 0.05% de Tween-20 ) y se sacudieron para eliminar el exceso de solución de lavado, se cubrieron con plástico parafilm, se etiquetaron y se almacenaron a 4°C, se usaron en un período no mayor a 2 meses.

**c).- Detección de anticuerpos.-** Para la determinación de anticuerpos contra BLV en el suero del animal, cada muestra se diluyó 1:10 en solución de dilución. (Tris-HCl. 0.15% de tween-20, 0.5% de albúmina de huevo, pH 7.5). Se colocaron 50  $\mu$ l por pozo por duplicado, se incubaron durante 2 hr a temperatura ambiente, después cada pozo se lavó 4 veces con solución de lavado, se adicionó un conjugado anti-IgG bovino marcado con fosfatasa alcalina a una dilución de 1:20,000 en solución de lavado, se agregaron 100  $\mu$ l por pozo, se incubó 1 hr a temperatura ambiente, después se retiró el conjugado y se lavo 4 veces, después de la última lavada se le agregó a cada

pozo una solución recién preparada de sustrato de NNP ( 5 mg/5ml de solución de diethanolamina-HCl 0.1 M pH 9.8 + 1 mM de  $MgCl_2$  ). Las placas se leyeron en un microlector de ELISA a un longitud de onda de 405 nm.

### **3.- Inmunoelectrotransferencia.**

#### **a).- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Método descrito por Laemmli-1970 (25).**

Se desnaturalizó la proteína total en solución de muestra a ebullición por 2 minutos, se colocaron 80  $\mu$ g de proteína por pozo en un gel de acrilamida al 12%, se usó para el corrimiento una solución balanceada de glicina, la muestra se corrió a 100 V (volts ) constantes durante 5 horas.

#### **b).- Transferencia en membrana de nitrocelulosa e Inmunodetección. Método descrito por Johanson- 1988 ( 22 ).**

Se utilizó un bastidor y sus componentes para transferir las proteínas, se formó un “sandwich” cuyo orden de los componentes en dirección de polo positivo a negativo fue el siguiente: un panel de fibra, papel filtro, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa ( MN ), papel filtro y el otro panel de fibra, posteriormente el bastidor se colocó en una cámara de transferencia (BIO-RAD) con solución balanceada de glicina-metanol, el tiempo de corrimiento fue de 12 hr a 200 mA constantes. Posteriormente la membrana de nitrocelulosa fue teñida con colorante rojo ponceau durante 5 minutos para visualizar las bandas de proteínas y se lavó con agua bidestilada para eliminar el colorante. Posteriormente la MN fue bloqueada con 10 ml de solución de TBS-TWEEN 2.5% durante 10 minutos, se retiró la solución y

se agregó el suero problema diluido 1:100. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavó la MN por 10 minutos, 2 veces con TBS-tween 0.05% y una vez con TBS, posteriormente se incubó por una hr con 5 ml de conjugado IgG antibovino marcado con peroxidasa en una dilución de 1: 5000 en TBS, Se lavó la MN por 10 minutos, 2 veces con TBS-tween 0.05% y una vez con TBS, se añadió como sustrato diaminobenzidina 0.05%, posteriormente se agregó 80  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 40 ml de solución de sustrato, se agitó hasta que se observaran las bandas en un tiempo aproximado de 10 minutos, se adicionó ácido clorhídrico para detener la reacción, finalmente se lavó dos veces con agua bidestilada.

### **III.- PURIFICACION DE IgG BOVINA**

Se mezclaron los sueros de los animales seropositivos por IDAG y la IgG fue purificada por precipitación de gamaglobulinas con un volumen de sulfato de amonio ( $\{NH_4\}_2 SO_4$ ) saturado, esta precipitación se realizó 3 veces, posteriormente el paquete fue resuspendido en un décimo del volumen original con PBS y dializado por 24 horas contra solución de boratos (para eliminar sulfato). La IgG se purificó en una columna sílica con proteína A sefarosa la cual fue lavada con solución A ( ver apéndice A ) para eliminar proteínas inespecíficas. Se cuantificó la elución obtenida con el método de microlowry y se guardó en congelación hasta el momento de su uso. Se obtuvo una concentración de 10.4 mg/ml por corrimiento en las alicuotas No. 4 y 5 de 2 ml cada una como se muestra en la figura 5., con un flujo constante de 12 ml/hr.

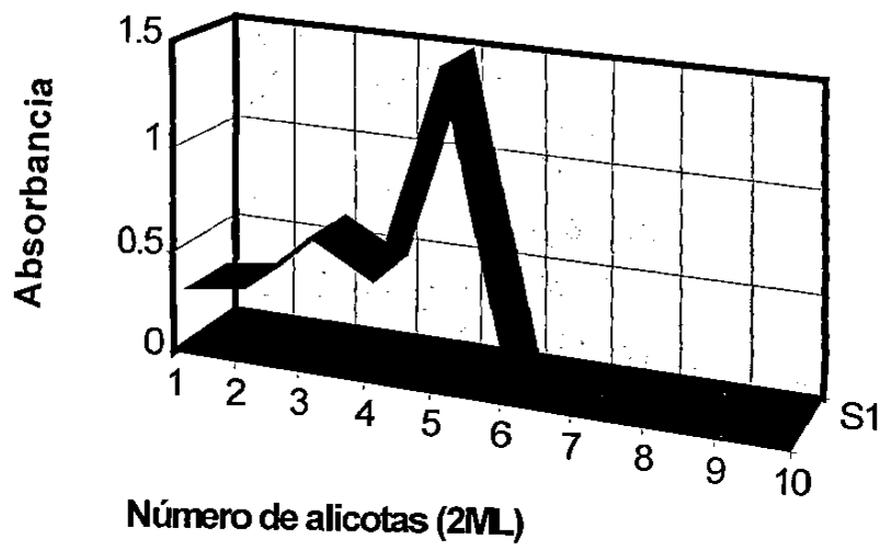
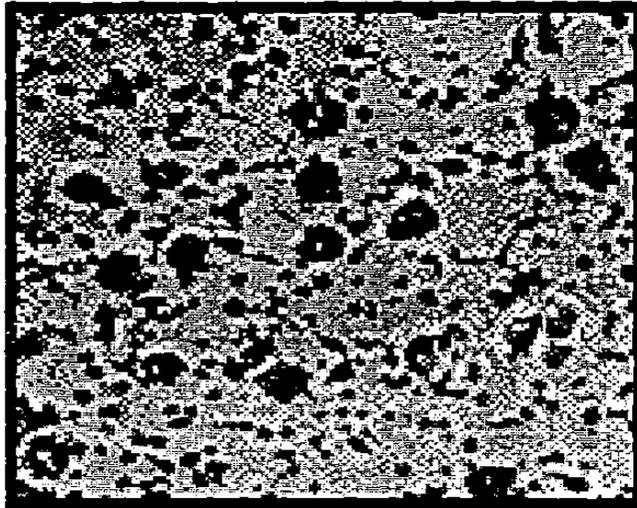


FIGURA 5.- PURIFICACION DE IgG BOVINA.

#### **IV.- CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES. Según el método descrito por la Dra. Janice M. Miller-1988 (33)**

El anillo de CM se obtuvo por aspiración con una pipeta pasteur, se lavó por centrifugación a 1500 RPM con 5 ml de medio RPMI-1640 sin suero, el paquete celular se resuspendió en 5 ml de medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB, 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomocina, posteriormente las CM fueron incubadas con diferentes tratamientos.



**Figura 6. CELULAS MONONUCLEARES DE UN ANIMAL INFECTADO CON BLV.- Son observadas en microscopio invertido ZEISS West Germany a un aumento de F10/0.25**

**V.- CULTIVO DE CELULAS FLK-BLV. Según el método descrito por la Dra. Janice M. Miller- 1988. (33).**

**a).- Propagación.**

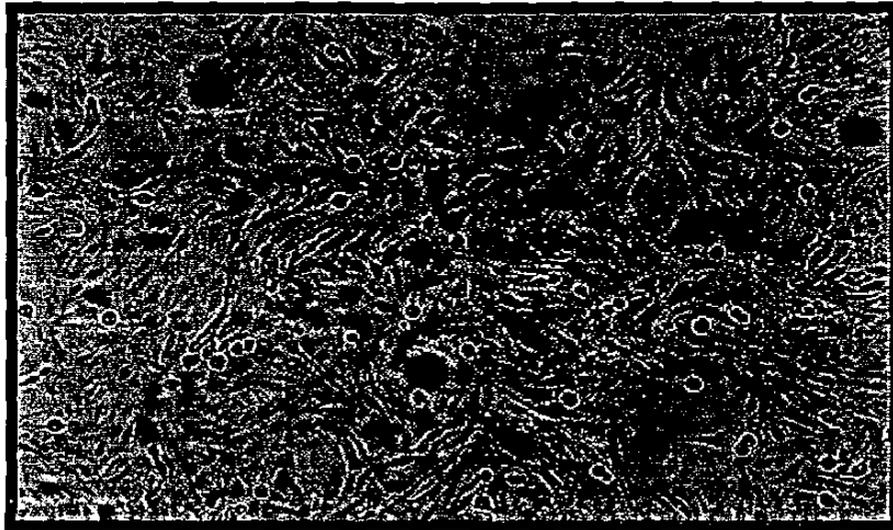
Se descongeló ( Nitrógeno líquido -196 °C ) un criotubo con la línea celular FLK-BLV ( células de riñón de ternera fetal infectada con BLV ) a baño maría a 37°C y se sembraron en MEMC ( medio esencial mínimo de crecimiento ) suplementado con 8% de SFB ( suero fetal bovino ), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, 2% de bicarbonato de sodio y 0.25% de lactoalbumina, usando frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, se realizaron subcultivos en una relación de 1:5 semanalmente usando 1 ml de EDTA ( ácido etilendiaminotetracético ) al 0.05% para la disgregación de la monocapa celular, se incubaron 2 minutos, posteriormente se eliminó el EDTA y se golpeó en un costado del frasco, se disgregaron las células por pipeteo con 5 ml de MEMC y se centrifugaron a 1500 RPM por 5 minutos, finalmente las células fueron resuspendidas en 5 ml de MEMC y distribuidas 1 ml de la suspensión celular por cada caja.

**b).- Conservación.**

Para la conservación de la línea celular FLK-BLV, se disgregó la monocapa de células usando EDTA al 0.05 %, posteriormente se centrifugó la suspensión celular ( para eliminar el EDTA ) a 1500 RPM por 10 minutos, se deshechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en MEMF ( medio esencial mínimo para congelación suplementado con 20% de SFB y

10% de dimetilsulfóxido ), posteriormente se realizó la distribución de las células ( $2 \times 10^6$  células/ml) en criotubos los cuales fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas, posteriormente en  $\text{CO}_2$  sólido (  $-70^{\circ}\text{C}$  ) durante 4 horas y finalmente en nitrógeno líquido (  $-196^{\circ}\text{C}$  ).

Nota: todo se trabajó en frío.



**FIGURA 7.- CELULAS FLK-BLV.-** Muestran 90% de confluencia celular, son observadas en microscopio invertido ZEISS West Germany a un aumento de F10/0.25

## **VI.- PRODUCCION Y PURIFICACION DE ANTIGENO Gp-51 . Según el método descrito por la Dra. Janice M. Miller y M.J. Van der Maaten-1977 (32).**

A cajas con 90% de confluencia celular se les retiró el MEMC y se restituyó por MEMM ( medio esencial mínimo de mantenimiento suplementado con 5% de SFB ), se colectó el medio 3 a 4 días después ( la colecta del medio se realizó repetidas veces hasta obtener aproximadamente 2 litros ) y se precipitó con sulfato de amonio, el precipitado se disolvió con PBS con una décima parte del volumen original del sobrenadante y se pasó a través de una columna conteniendo sepharosa-ConA. Los lavados se realizaron con PBS y se eluyó con una solución de alfa-D-manosidasa al 0.1 M. La solución obtenida de la elución ( conteniendo las glicoproteínas) fue utilizada para la pruebas de inmunodifusión en agar gel y ELISA.

## **VII.- EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE PROTEINAS**

### **A.- Método de deoxicolato de sodio.**

Las células FLK-BLV y/o CM de sangre periférica se lavaron con PBS 1X ( solución balanceada de fosfatos ), el paquete se pasó a un tubo eppendorf y se le adicionó 200 µl de solución de lisis ( 20 mM de tris HCl pH 7.5, 1 mM de EDTA, 80 mM de NaCl, 1% DE NP40 y 0.2 % de deoxicolato de sodio), el extracto celular se sometió a 3 ciclos de congelación-descongelación, posteriormente se centrifugó a 14,000 RPM durante 2 minutos y el paquete obtenido se resuspendió en 100 µl de PBS, la concentración de proteína fue determinada por el micrométodo de lowry.

**B.- Método de TRIZOL. Según método descrito por Chomeczynski-1993 (5).**

Las células FLK-BLV y/o las CM de sangre periférica fueron lisados con 1 ml de trizol (Gibco BRL., Gaithersburg, M.D. ) e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente, en un tubo eppendorf, posteriormente se adicionó 200  $\mu$ l de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos , se incubó por 2 ó 3 minutos y se centrifugó a 12,000 RPM por 5 minutos a 4°C. Después de la centrifugación la mezcla se separó en una fase inferior roja que es la fase orgánica ( fenol cloroformo ), en una interfase y en una fase superior acuosa. Se tomó la fase inferior roja y se adicionó 1 ml de isopropanol, se centrifugó a 12,000 RPM por 5 minutos, se retiró el sobrenadante. Se adicionó 200  $\mu$ l de SDS 0.1% a la pastilla, se disolvió, se dializó por 24 horas contra SDS 0.1% y posteriormente otras 24 horas contra SDS 1%. La concentración de proteína fue determinada con el micrométodo de lowry.

**C.- Cuantificación de proteínas por el micrométodo de LOWRY- 1951 (28) .**

**1.- Preparación de la curva estándar.-** Se preparó una solución stock de proteína con albúmina de huevo ( 1mg/ml ).

Tabla 1.- Curva del estándar

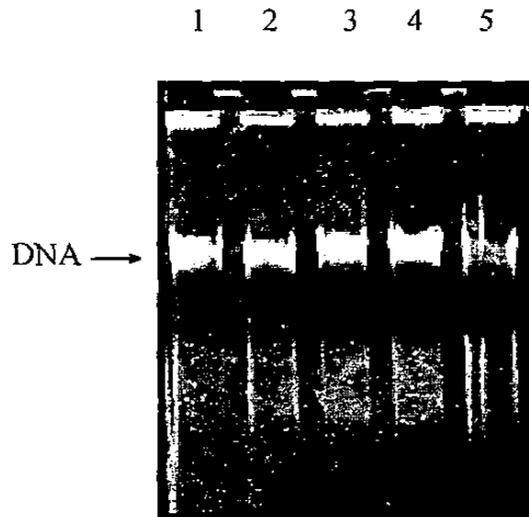
TUBO	STOCK	AGUA	CONCENTRACION (Mg/ml)
1	0.0	200.0	0.000
2	12.5	187.5	0.025
3	25.0	175.0	0.125
4	50.0	150.0	0.250
5	75.0	125.0	0.375
6	100.0	100.0	0.500

**2.- Preparación de la muestra.-** Se realizaron diluciones seriadas de 10  $\mu$ l de la suspensión de proteínas. En una placa de 96 pozos se colocaron 100  $\mu$ l/pozo de la dilución de proteínas virales de las células FLK-BLV y de linfocitos infectados ( todas las muestras se colocaron por duplicado ). Se agregaron 25  $\mu$ l de solución de tartrato de cobre 5X (ver apéndice), la placa se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 10  $\mu$ l de la solución de Folin, posteriormente se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y finalmente se realizó la lectura a 630 nm.

## VIII.- PRUEBAS MOLECULARES

### 1.- Extracción de DNA. Según método descrito por Curtis A. Hanson & John H. Kersey-1988 (7).

Las células mononucleares no cultivadas (  $5 \times 10^6$  células ) previamente centrifugadas para eliminar el medio de cultivo PBS 1X fueron colocados en un microtubo de 1.5 ml que contenía 500  $\mu$ l de solución de lisis ( 10 mM de tris-HCl pH 8, 10 mM de NaCl y 10 mM de EDTA ), 10  $\mu$ l de proteinasa K, 50  $\mu$ l de SDS al 20% y 50  $\mu$ l de EDTA 500 mM, el microtubo fue incubado toda la noche a 55°C, posteriormente se realizó la extracción de DNA con fenol saturado, se adicionó 500  $\mu$ l de fenol saturado y se agitó suavemente, se centrifugó 4 minutos a 12000 RPM y la solución acuosa fue removida lentamente para evitar contaminación con proteínas precipitadas y se depositó en otro microtubo, este procedimiento se repitió dos veces, a la fase acuosa se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol frío ( -20° C ) y se incubó toda la noche a -20°C, posteriormente se centrifugó a 12000 RPM por 15 minutos. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla se secó a temperatura ambiente, posteriormente se resuspendió con solución balanceada de Tris-EDTA. Para observar la integridad del DNA se corrió en un gel de 0.8 % de agarosa a 70 V constantes y la concentración se determinó por absorción a 260 nm.y se ajustó a 250 ng/ $\mu$ l. Figura 8.



**FIGURA 8.- PATRON ELECTROFORETICO DEL DNA DE 5 ANIMALES PROBADOS.** La electroforesis se realizó en un gel de agarosa 0.8%, de la línea 1-5 se observa la banda característica del DNA de células mononucleares de los animales Nos. 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

**2.- Reacción en cadena de la polimerasa . ( Detección del provirus ). Método descrito por M.P. Murtaugh y colaboradores- 1991 (38).**

La reacción se realizó con 0.5 µg de DNA, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 ng de cada primer ( ver tabla No. 2 ), 10 mM de tris HCl, y 1 µl de tac DNA polimerasa (1U/µl ), las condiciones para la reacción estándar consistieron de 94°C/ 1 min., 50°C/ 0.5 min. y 72°C/ 0.30 min. por 30 ciclos. Los productos se analizaron en un gel de 20 % de poliacrilamida y 8 M de urea y se visualizaron con luz ultravioleta después de ser teñido con bromuro de etidio.

### **3.- Extracción de RNA por el método de TRIZOL. Según método descrito por Chomeczynski-1993 ( 5 ).**

Las células FLK-BLV y las CM de sangre periférica (  $5 \times 10^6$  células ) fueron lisadas con 1 ml de trizol ( TRI REAGENT <sup>TM</sup> ) e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se le adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se agitaron vigorosamente por 15 segundos, la mezcla se incubó por 2 ó 3 minutos y se centrifugó a 12,000 g por 5 minutos a 4 ° C. Después de la centrifugación la mezcla se separó en una fase inferior roja que es la fase orgánica ( fenol cloroformo ), en una interfase y en una fase superior acuosa. Se tomó la fase acuosa en la cual se encuentra el RNA y se precipitó en un microtubo con 0.5 ml de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 5 ó 10 minutos, se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4 °C. Se lavó el paquete de RNA con etanol al 70 %. Para la solubilización del RNA se removió el etanol al 70% y se disolvió el paquete con agua tratada con DEPC ( Dietilpirocarbonato ), se incubó por 10 ó 15 minutos a 55-60° C. Posteriormente se procedió a la síntesis del cDNA.

**4.- Reacción en cadena de la polimerasa con productos de la transcriptasa reversa. ( Detección de productos de expresión ). Método descrito por M.P. Murtaugh y colaboradores- 1991 (38).**

Para la síntesis de cDNA se adicionó en un microtubo un volumen correspondiente a 5 µg de RNA, 5 µl de solución amortiguadora RT ( Transcriptasa Reversa ), 1 µl de DTT ( Dithiotreitol ) 10 mM, 1 µl de inhibidor de Rnasas ( RNAsin ), 4 µl de dNTP 10 mM (quedando al final con una concentración de 0.2 mM), 1 µl de oligo (dT) (12-18- 0.5 mg/ml ) para genes constitutivos y para genes de regulación se utilizó 1 µl (5 nanomoles ) de random hexamero (50 µM), posteriormente se adicionó 1 µl de Superscript RT ( Transcriptasa Reversa 1 U/µl ), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM y se aforó con agua tratada con DEPC al 0.5 % a un volumen final de 30 µl. Esta mezcla se incubó a 37° C por 1 hora y media y a 90°C por 10 minutos, posteriormente se realizó PCR de los genes constitutivos y de regulación de BLV.

**a) Genes constitutivos**

La reacción se realizó usando 0.5 µg de DNAc, se adicionó el volumen necesario para esta concentración de DNA, posteriormente se adicionó 9 µl de dNTP ( quedando al final con una concentración de 0.2 mM ), 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl (50 ng/µl) de “primer” sentido y antisentido ( ver tabla No. 2 ), 5 µl de solución de Tris HCl 20X, 1 µl de tac DNA polimerasa (1U/µl ) y se aforó con agua purificada estéril a un volumen de 25 µl.

**b) Genes reguladores ( Región pX ).- Método descrito por L. Hass y colaboradores- 1992 ( 17 ).**

Se adicionó en un microtubo el volumen correspondiente para 0.5 µg de cDNA, posteriormente se adicionó 5 µl de solución de Tris-HCl 10 X, 1 µl de cada dNTP 10 mM (quedando al final con una concentración de 0.2 mM ), 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.5 µl de tac DNA polimerasa ( 1 U/µl ), 2 µl de “primer” sentido y antisentido ( 0.5 µM ) ( “primer” para el gen pX ver tabla No. 2 ), posteriormente se aforó con agua purificada estéril a un volumen de 50 µl. \*Los productos se analizaron en un gel de acrilamida al 6% y se visualizó con luz ultravioleta después de ser teñido con bromuro de etidio.

Para analizar la expresión de los productos de RT-PCR de acuerdo a la intensidad de las bandas se realizaron las lecturas de los electroforetogramas en un densitómetro marca Beckman (APPRAISE - JUNIOR-DENSITOMETER ).

Tabla 2.- Características y secuencia de los “primers” usados en la amplificación de los genes constitutivos y de regulación del virus de la leucosis bovina.

NOMBRE	TAMAÑO	SECUENCIA	% G/C
POL	SENTIDO-22	GTG TCC TAT ATG GAC GAT ATC C	45
	ANTISENTIDO- 21	AGT CTG CAG GTA TTG GCA TCC	52
ENV	SENTIDO-20	GTC TCC CAG ATA CAC CTT GG	55
	ANTISENTIDO-20	GAA GGT TCC CAA CAT ATA GC	45
GAG	SENTIDO- 20	CTG ACC TAG AAC AAC TTT GC	45
	ANTISENTIDO-21	GAC GAG TAG GGA GAT TTT TCC	47
PX	SENTIDO-20	CAA AAC AAT CGT CGG TGG CT	50
	ANTISENTIDO-20	GAT GGT GAC ATC ATT GGA CA	45

## **RESULTADOS**

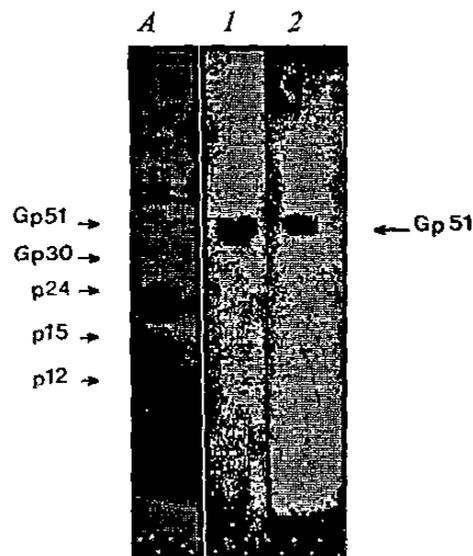
### **I.- SELECCION DE LOS ANIMALES**

Se trabajó con un hato lechero de la zona metropolitana de Monterrey, N.L con una prevalencia del 60% al BLV. Se sometieron 10 animales a las pruebas de IDAG, ELISA, IET y PCR. Se seleccionaron las vacas No. 8 y No. 9 que resultaron positivas a todas las pruebas diagnósticas (Tabla No. 3). El resto de los animales no fueron seleccionados debido a que no presentaron reactividad a todas las pruebas y/o a que fueron dadas de baja del hato por baja producción láctea y problemas reproductivos. Se seleccionó la vaca No. 10 como control negativo la cual resultó negativa a todas las pruebas.

### **DETECCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA BLV**

Con el objeto de observar la presencia de anticuerpos anti-BLV se realizaron 2 inmunodifusiones consecutivas con un intervalo de 6 meses a cada uno de los 10 animales dado que puede haber variación en el tipo de anticuerpo producido con respecto al estadio de la enfermedad. Se observó que en la primera IDAG solo 7 de los animales fueron seropositivos y 3 seronegativos. Posteriormente en la segunda IDAG aumentó el número de seropositivos de 7 a 9 y uno resultó seronegativo (Tabla No. 3). Sin embargo los dos últimos animales seroconvertidos presentaron reactividad débilmente positiva a la IDAG. Por otro lado los animales que resultaron seronegativos a la primera IDAG (vacas Nos. 4 y 6) presentaron reactividad a la Gp51 con el método de extracción de Deoxicolato de sodio, mientras que por el método de extracción con trizol ambos animales presentaron reactividad a todas las

proteínas virales como se muestra en la figura 9, sin embargo estos dos animales fueron negativos por el método de ELISA. Se tomó en consideración el método de Trizol para realizar la extracción de proteínas de las células FLK-BLV y células mononucleares para determinar su expresión “in vitro “ con los tratamientos.



**FIGURA 9.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA PARA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA BLV DE LOS ANIMALES SEROPOSITIVOS POR IDAG.** En la tira A las proteínas fueron extraídas a partir de la línea celular FLK-BLV por el método de trizol. En las tiras de nitrocelulosa 1, 2, la extracción se realizó por el método de dioxicolato de sodio. Tira A y 1.- Reactividad de la vaca No. 4. Tira 2.- vaca No. 6 .

## **II.- DETECCIÓN DEL PROVIRUS EN EL DNA DE CM DE ANIMALES SEROPOSITIVOS A BLV**

La detección del provirus se realizó con la prueba de PCR, una vez que se estandarizaron las condiciones utilizando las células FLK-BLV, se probó la concentración de 3 mM de MgCl<sub>2</sub> debido a que en las reacciones donde se usó la recomendada por la casa comercial (EPICENTRE TECHNOLOGIES) 1.5 mM no se observó amplificación del gen POL ( carril No. 1 ) y la amplificación del gen ENV ( carril No. 2 ) fue casi inapreciable, únicamente en el carril No. 3 se observó amplificación del gen GAG. Se utilizó la concentración 3.0 mM y se observó amplificación de todos los genes virales como se observa en la figura No.10 (carriles 4, 5 y 6 ).

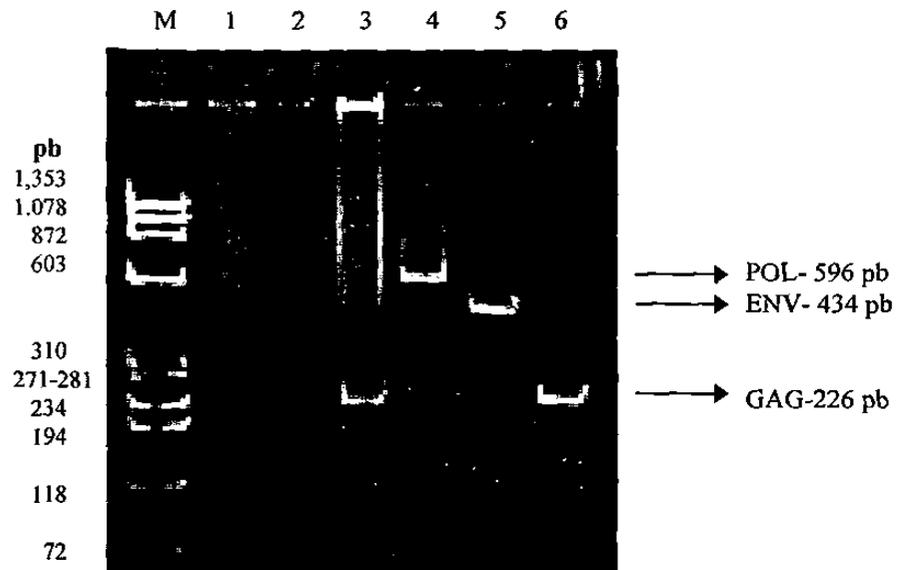
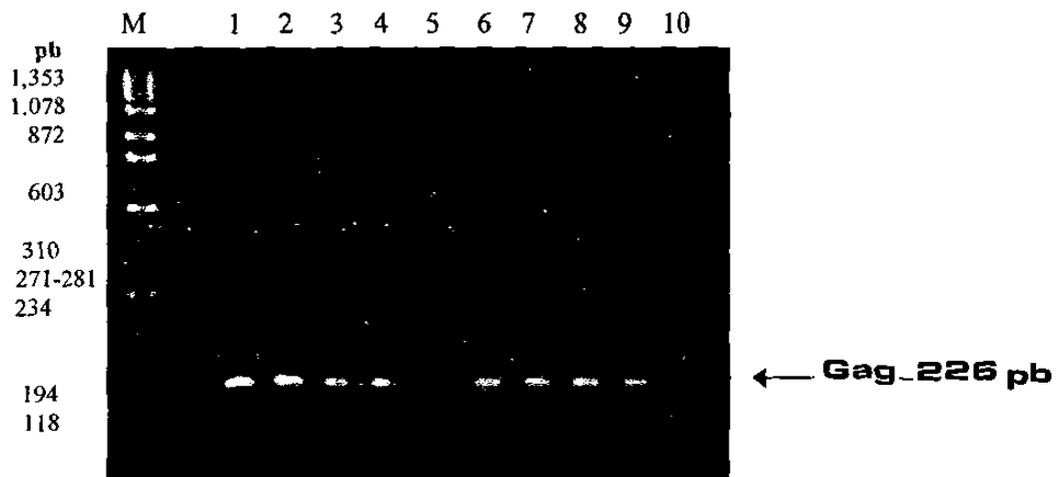


FIGURA 10.- PRUEBA DE PCR PARA LA DETECCION DE GENES DE BLV CON DOS CONCENTRACIONES DE  $MgCl_2$ . Los carriles 1, 2 y 3 muestran los genes POL, ENV y GAG que fueron amplificados en presencia de 1.5 mM de  $MgCl_2$ . Los carriles 4, 5 y 6 muestran los mismos genes pero amplificados con 3.0 mM de  $MgCl_2$ .

El PCR fue determinante para la selección de los animales a probar. Una vez estandarizadas las condiciones los 10 animales se sometieron a la prueba de PCR para detectar la presencia del gen GAG, se utilizó la concentración de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, todos los animales seropositivos presentaron amplificación excepto el No. 5 (Tabla No. 3) y la muestra seronegativa (vaca No. 10) no presentó amplificación tal como se muestra en la figura No. 11, tabla No. 3.



**FIGURA 11.- PCR PARA EL GEN GAG DE BLV DE LOS ANIMALES PROBADOS POR SEROLOGIA.**  
M: Marcador de peso molecular X174. Carriles del 1-9.- Animales seropositivos a BLV. Carril 10.- Animal seronegativo a BLV.

La tabla No. 3 presenta los resultados de las diferentes pruebas serológicas y de la prueba de PCR que fueron considerados para la selección de los animales.

**TABLA 3.- Reactividad a las pruebas serológicas para la selección de los animales.**

No de animales	1 <sup>er</sup> IDAG	2 <sup>o</sup> IDAD	WB	ELISA	PCR
1 <sup>o</sup>	+	+	+	+	+
2 <sup>o</sup>	+	+	+	+	+
3 <sup>o</sup>	+	+	+	+	+
4	-	+	+	-	+
5	+	+	+	+	-
6	-	+	+	-	+
7 <sup>o</sup>	+	+	+	+	+
8 <sup>*</sup>	+	+	+	+	+
9 <sup>*</sup>	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-

\* vacas seleccionadas para el estudio

° vacas positivas a todas las pruebas pero que fueron dadas de baja del hato.

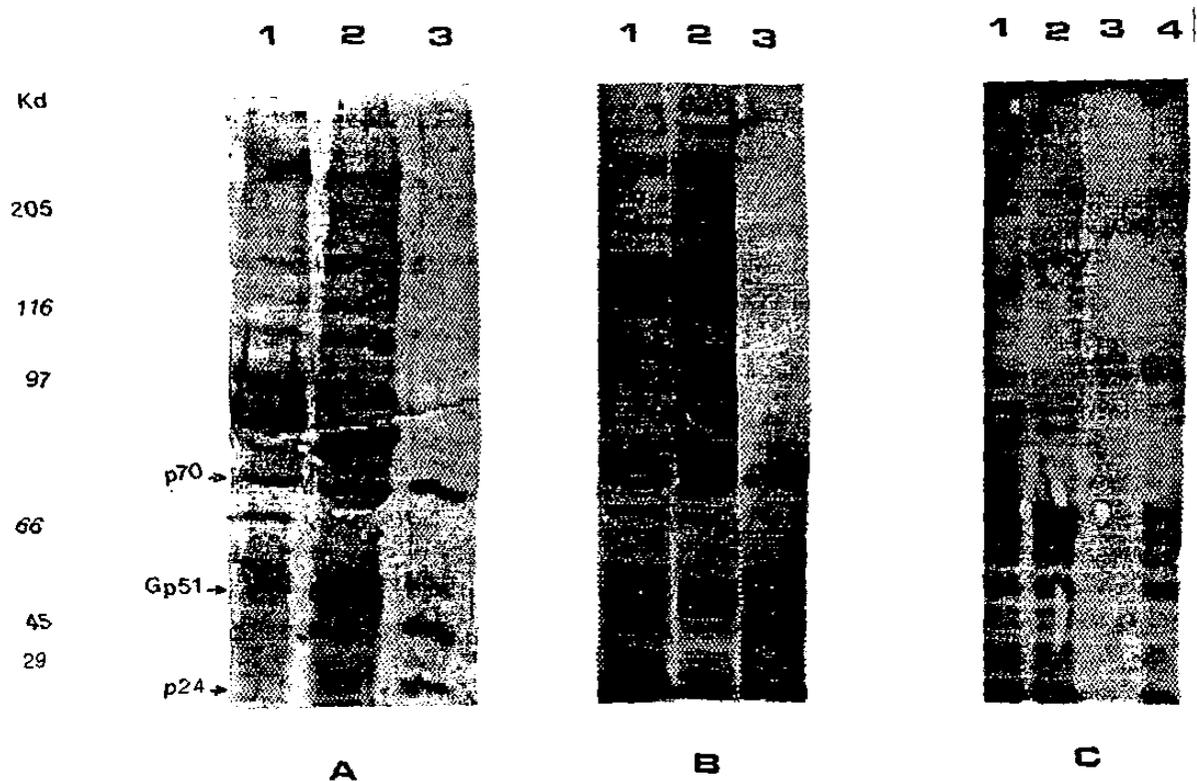
### **III.- EFECTO DE FACTORES DE PLASMA Y SUERO AUTOLOGOS E IgG EN LA TRANSCRIPCION Y TRADUCCION DE LOS GENES CONSTITUTIVOS Y DE LA REGION pX DE BLV EN CELULAS FLK-BLV.**

Se cultivaron  $1 \times 10^6$  células/ml en frascos de  $25 \text{ cm}^2$  con medio MEMC suplementado con 8% de SFB, una vez que el cultivo alcanzó 90% de confluencia celular ( aproximadamente  $4 \times 10^6$  células ) se sometió por 24 horas a diferentes tratamientos: 20% de plasma autólogo; 20% de suero autólogo; 150  $\mu\text{g/ml}$  de IgG de animales positivos a BLV y 20% de SFB como control.

#### **1.- INMUNODETECCION DE PROTEINAS VIRALES.**

La prueba de IET fue utilizada para observar la expresión de las proteínas virales producidas en células FLK-BLV cultivadas con diferentes tratamientos. En la figura 12A se muestra la IET de las células tratadas con suero fetal bovino ( 1 ), suero autólogo ( 2 ) y plasma ( 3 ), se observa un perfil amplio de proteínas reactivas a anticuerpos contra BLV (obtenidas a partir de una vaca fuertemente positiva), en el tratamiento 2 se observa una concentración mayor de Gp51 con respecto al tratamiento 1 ( control ), mientras que en las células tratadas con plasma se observa un número menor de proteínas reactivas con una intensidad menor ( a excepción de la p70 y p45, que son precursores de las proteínas virales p12, p15 y p24 ) y la expresión de la Gp-51 se encuentra disminuida con respecto a los otros tratamientos. En las figuras 12B y 12C se muestra el patrón electroforético de

las proteínas reactivas a un pool de sueros de vacas positivas al virus, en la figura 12B con el tratamiento 3 (plasma) se observa una aparente inhibición de todas las proteínas virales ( Gp-51, p24, p30, etc. ) excepto en la proteína p70 en comparación con los tratamientos de suero autólogo y suero fetal bovino. Por otro lado en la figura 12C se observa mayor expresión de proteínas virales en los tratamientos 1 y 2 ( suero autólogo e IgG respectivamente ) con respecto al control, mientras que con plasma se observa franca disminución en todas las proteínas virales. Las células tratadas con SA, IgG y SFB presentan el mismo perfil proteico, sin embargo las proteínas se observan más intensas en los tratamientos de SA e IgG.



**FIGURA 12.-** Inmunoelectrotransferencia de proteínas virales de células FLK-BLV con suero policlonal anti-BLV cultivadas con diferentes tratamientos.

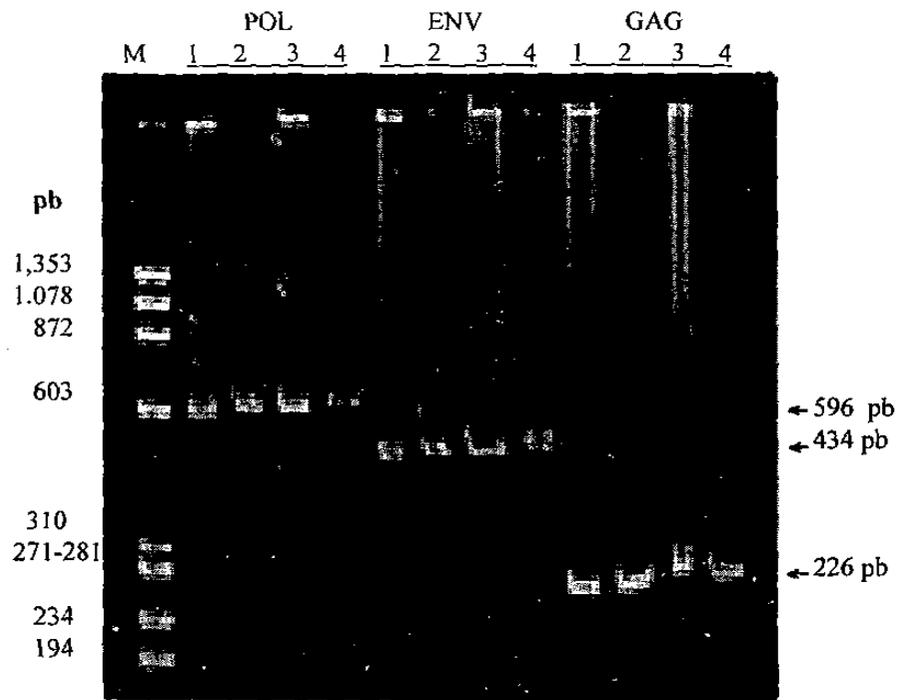
A.- 1.- 20% SFB, 2.- 20% suero autólogo, 3.- 20 % plasma autólogo

B.- 1.- 20% suero autólogo, 2.- 20% SFB, 3.- 20% plasma autólogo

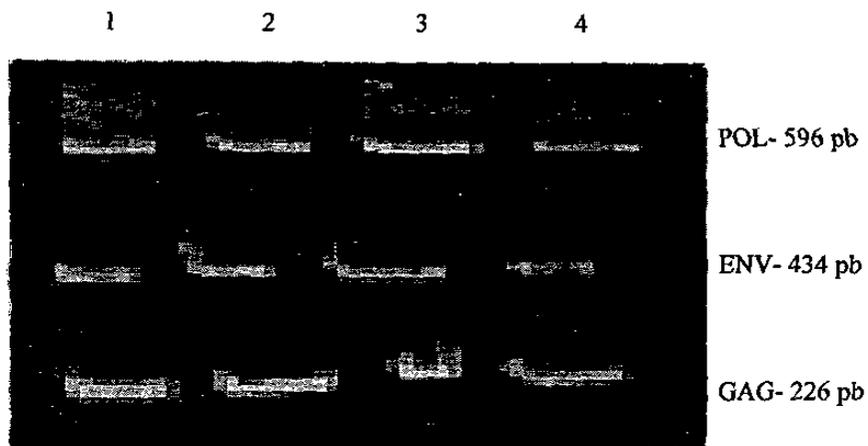
C.- 1.- 20% suero autólogo, 2.- 150 µg/ml de IgG bovina, 3.- 20% plasma autólogo, 4.- 20% SFB.

## **2.- DETECCION DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE RNAm DE LOS GENES CONSTITUTIVOS DE BLV POR RT-PCR.**

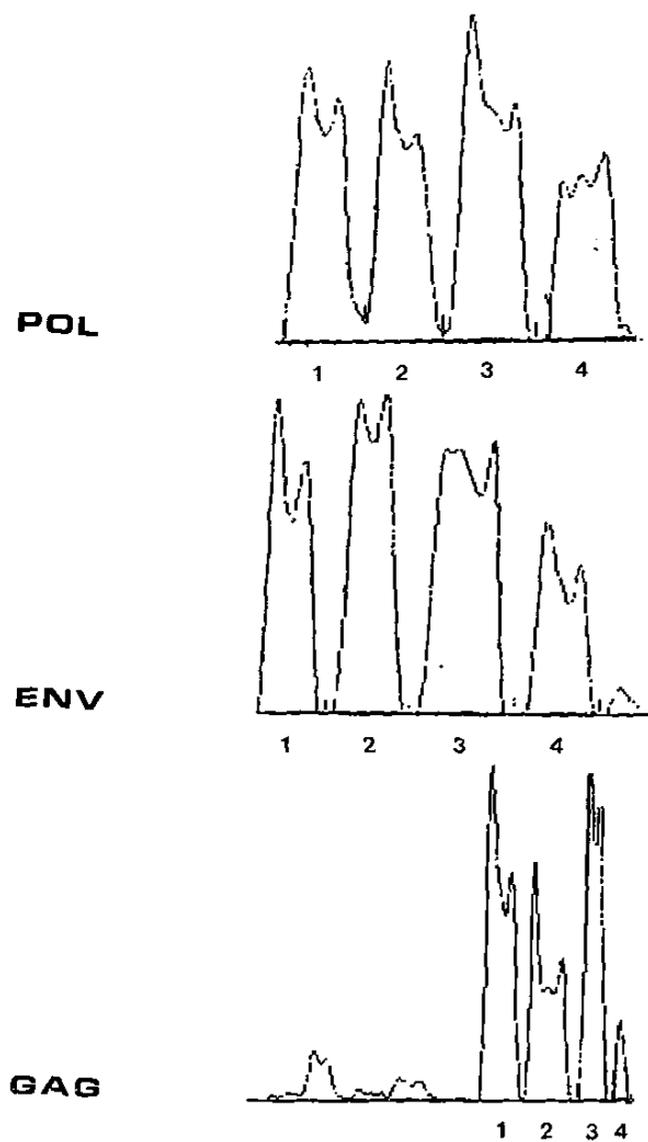
La expresión de los genes estructurales y de la polimerasa de BLV fueron medidos por RT-PCR con oligonucleótidos específicos para regiones de POL, ENV y GAG ( ver tabla 2 ) en células FLK-BLV tratadas con suero y plasma autólogos, IgG y SFB como control, la figura 13 presenta el patrón electroforético de los productos amplificados de los genes POL, ENV y GAG, en el perfil de densitometría del electroforetograma de la figura 13 ( figura No. 15 ) se observa que el producto amplificado del gen GAG se presenta en mayor intensidad que los productos de los genes POL y ENV como ha sido reportado siendo este último el que se expresa en menor proporción. La figura 14 presenta un rearrreglo de la figura 15 en donde se observa en forma más detallada la intensidad de los productos de PCR de los genes virales. En el gen POL se aprecia una expresión similar en los tratamientos 1 y 2 ( SA y SFB ), sin embargo, con IgG se observa mayor expresión. En el tratamiento con plasma se observa disminución con respecto a los otros tratamientos. El gen ENV muestra en los tratamientos 1,2, y 3 una similar expresión, mientras que se observa menor expresión en el tratamiento con plasma. Analizando el gen GAG se observa el mismo comportamiento que para el gen ENV con menor expresión en plasma que con los otros tratamientos. Estos resultados reflejan el efecto inhibitorio del plasma en la expresión de los 3 genes y el efecto estimulador de IgG en la expresión de POL.



**FIGURA 13.- R-T-PCR DE LOS GENES GAG, POL Y ENV DE BLV EN LA LINEA CELULAR FLK-BLV CULTIVADA CON DIFERENTES TRATAMIENTOS. Líneas 1.- 20% de suero autólogo. 2.- 20% de SBF (control ). 3.- 150µg/ml de IgG. 4.- 20% de plasma autólogo.**



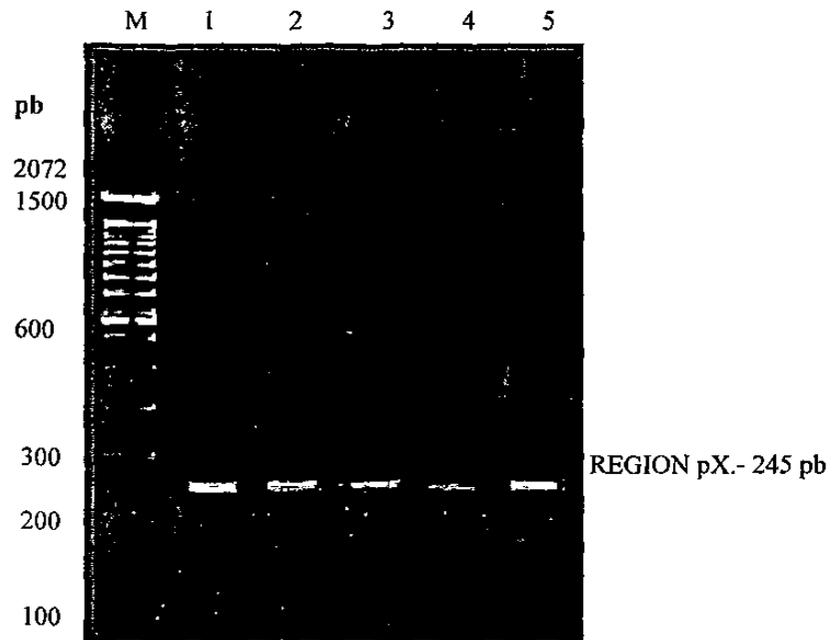
**FIGURA 14.- REARREGLO DETALLADO. R-T-PCR DE LOS GENES GAG, POL Y ENV DE BLV EN LA LINEA CELULAR FLK-BLV CULTIVADA CON DIFERENTES TRATAMIENTOS. Líneas 1.- 20% de suero autólogo. 2.- 20% de SBF (control ). 3.- 150µg/ml de IgG. 4.- 20% de plasma autólogo.**



**Figura 15.-** Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR de los genes constitutivos de BLV en la línea celular FLK-BLV . 1.- 20% suero autólogo, 2.- 20% suero fetal bovino, 3.- 150 µg/ml de IgG bovina y 4.- 20% plasma autólogo.

### **3.- DETECCION DE LOS NIVELES DE EXPRESION DEL RNAm DE LA REGION pX DE BLV POR RT-PCR.**

Se analizó el efecto de los tratamientos sobre el nivel de expresión de la región pX en la línea celular FLK-BLV. La figura 16 muestra el patrón electroforético de los productos amplificados de la región pX donde se observa que existe una clara disminución con el tratamiento de plasma autólogo ( carril No. 4 ), por otra parte en las células tratadas con suero autólogo ( carril No. 1 ) se observa una banda de mayor intensidad con respecto a los otros tratamientos lo que nos sugiere un aumento en el nivel de expresión del gen pX bajo estas condiciones, en el tratamiento con IgG ( carril No. 3 ) el nivel de intensidad es similar al control ( carril No. 2). Estos resultados se pueden apreciar con mayor claridad en el perfil de densitometría del electroforetograma de la figura 16 ( figura 17 ).



**FIGURA 16.-** RT-PCR DE LA REGION pX DE BLV EN CELULAS FLK-BLV CULTIVADAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS. Línea 1.- 20% de suero autólogo, 2.- 20% de SFB ( control ), 3.- 150 µg/ml de IgG, 4.- 20% de plasma autólogo, 5.- PCR del DNA de células FLK-BLV.

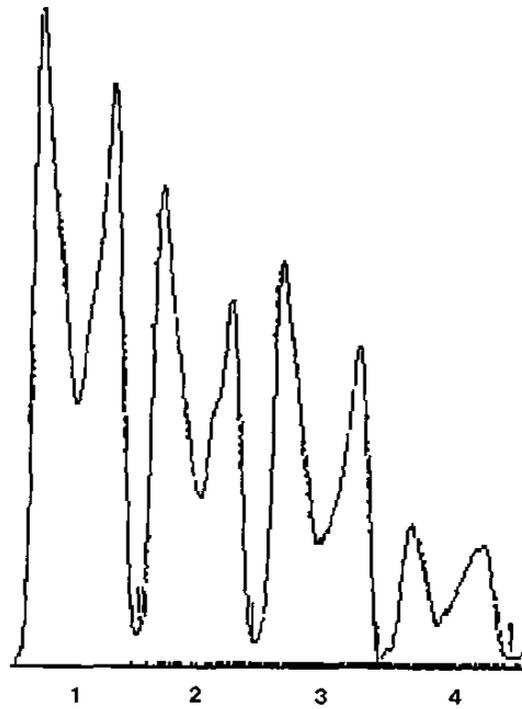


Figura No. 17.- Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR del gen regulador pX en células FLK-BLV . 1.- 20% suero autólogo, 2.- 20% suero fetal bovino, 3.- 150  $\mu$ g/ml de IgG bovina y 4.- 20% plasma autólogo.

#### **IV.- NIVELES DE EXPRESION DE LOS GENES CONSTITUTIVOS Y DE REGULACION DE BLV EN CM INFECTADAS CULTIVADAS CON FACTORES DE PLASMA Y SUERO AUTOLOGO O IgG**

Con el fin de determinar el efecto de los factores de plasma y suero autólogos e IgG sobre la expresión de los genes constitutivos y de regulación en CM infectadas se seleccionaron los animales Nos. 8 y 9 positivos a BLV de los cuales se obtuvieron CM, suero y plasma. Se cultivaron  $4 \times 10^6$  células mononucleares en cajas de  $25 \text{ cm}^2$  en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y se sometieron por 24 horas a los siguientes tratamientos : 20% de plasma autólogo, 20% de suero autólogo, 150  $\mu\text{g/ml}$  de IgG de animales positivos a BLV o 20% de SFB como control.

##### **1.- INMUNODETECCION DE PROTEINAS VIRALES**

Con el propósito de observar la expresión de proteínas estructurales de BLV de CM en los animales infectados Nos. 8 y 9 cultivados con los tratamientos descritos se realizó la prueba de IET ( con anticuerpos contra BLV obtenidos de un pool de sueros de vacas altamente seropositivas al virus ) como se observa en la figura No.18 y tabla 4, en ambas vacas las células tratadas con plasma autólogo ( tratamiento No. 4 ) presentan disminución en la expresión de Gp-51 y de forma más evidente de p24 con respecto a los otros tratamientos. Mientras que las células tratadas con suero autólogo (tratamiento N.2) y con IgG ( tratamiento No.3 ) muestran mayor expresión de Gp-51 con respecto al tratamiento control.

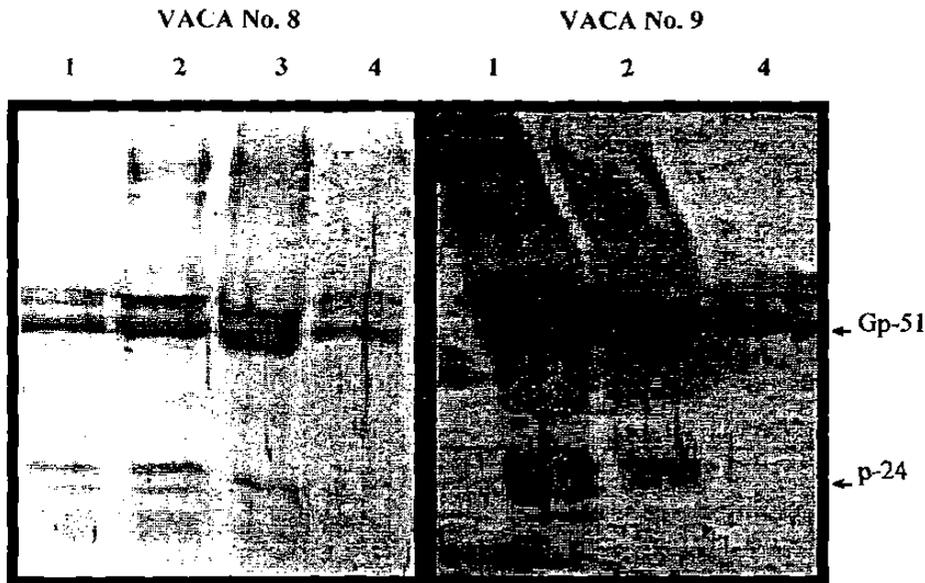


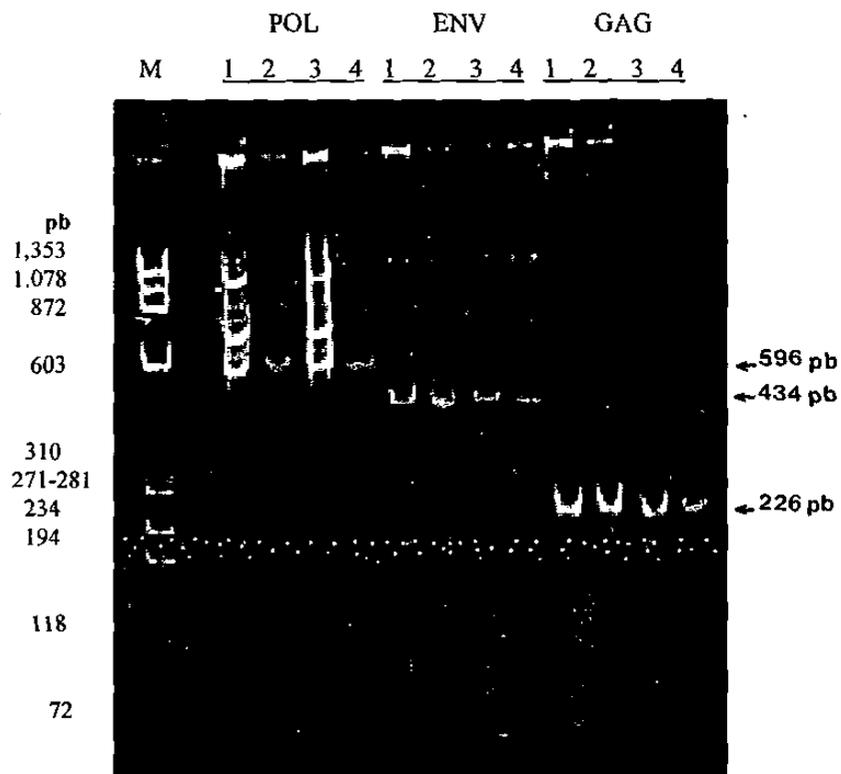
FIGURA 18.- Inmunoelectrotransferencia de proteínas virales de CM de las vacas Nos. 8 y 9 con suero policlonal anti-BLV cultivadas con diferentes tratamientos. Línea 1.- 20 % de SFB, 2.- 20% de suero autólogo, 3.- 150 µg/ml de IgG, 4.- 20% de plasma autólogo.

## 2.- DETECCION DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE RNAm DE LOS GENES CONSTITUTIVOS DE BLV POR RT-PCR

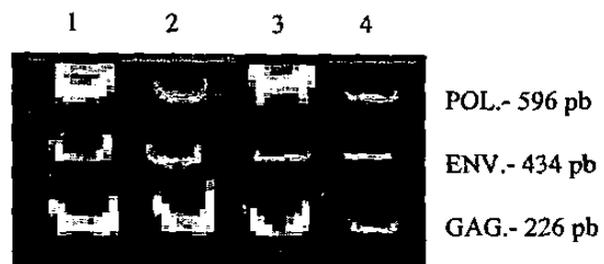
### a).- ANALISIS DE LA VACA No. 8.

Se analizaron los productos amplificados de RNAm virales a partir del cDNA de las CM de la vaca No. 8 cultivadas con los diferentes tratamientos como se muestra en las figuras 19, 20 y en el perfil de densitometría del electroforetograma de la figura 19 ( figura No. 21 ) y tabla 4. La intensidad de las bandas obtenidas nos indica que las CM cultivadas con plasma autólogo presentan una marcada disminución en los niveles de expresión de los 3 genes constitutivos siendo en el gen POL en donde se observa una inhibición más acentuada, mientras que las CM cultivadas con suero autólogo presentan un

mayor nivel de expresión de estos genes virales comparado con las CM cultivadas con los otros tratamientos, por otro lado los genes ENV y GAG de las CM cultivadas con IgG presentaron un nivel de expresión ligeramente menor al control siendo el gen ENV el que presenta un nivel menor. Con respecto al suero autólogo e IgG la expresión en el gen POL aparentemente es igual en ambos tratamientos.



**FIGURA 19.- RT-PCR DE LOS GENES GAG, POL Y ENV DE BLV EN CM INFECTADAS DE LA VACA No. 8 CULTIVADAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS. Línea 1.- 20% de suero autólogo, 2.- 20 % de SFB, 3.- 150 µg/ml de IgG. 4.- 20% de plasma autólogo.**



**FIGURA 20.- REARREGLO DETALLADO. RT-PCR DE LOS GENES GAG, POL Y ENV DE BLV EN CM INFECTADAS DE LA VACA No. 8 CULTIVADAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS. Línea 1.- 20% de suero autólogo, 2.- 20 % de SFB, 3.- 150 µg/ml de IgG, 4.- 20% de plasma autólogo.**

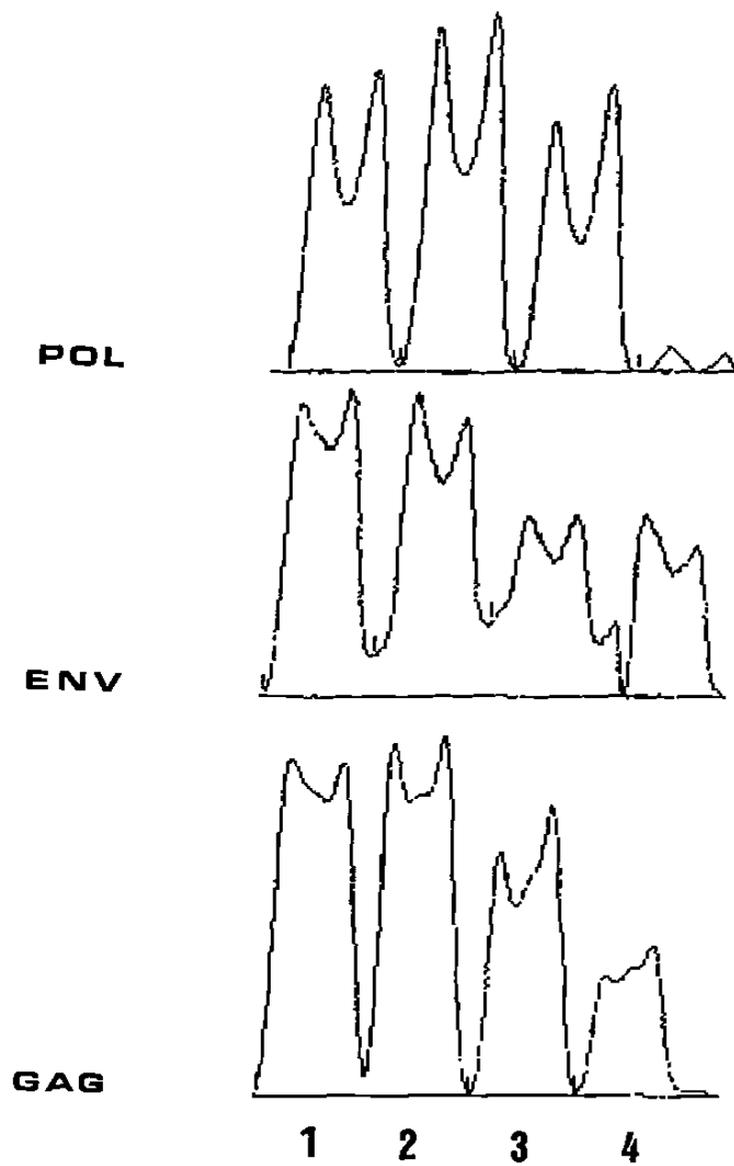
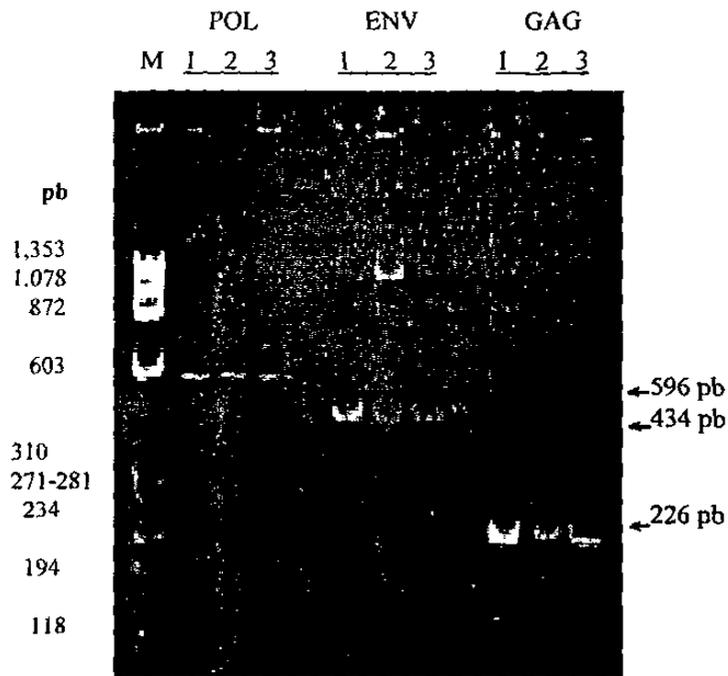


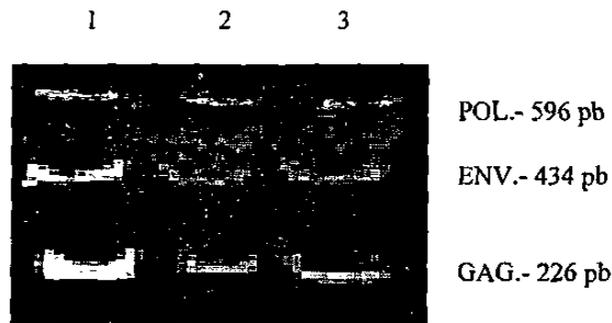
Figura 21.- Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR de los genes constitutivos de BLV de CM de la vaca No.8 . 1.- 20% suero autólogo, 2.- 20% suero fetal bovino, 3.- 150 µg/ml de IgG bovina y 4.- 20% plasma autólogo.

b) ANALISIS DE LA VACA No. 9

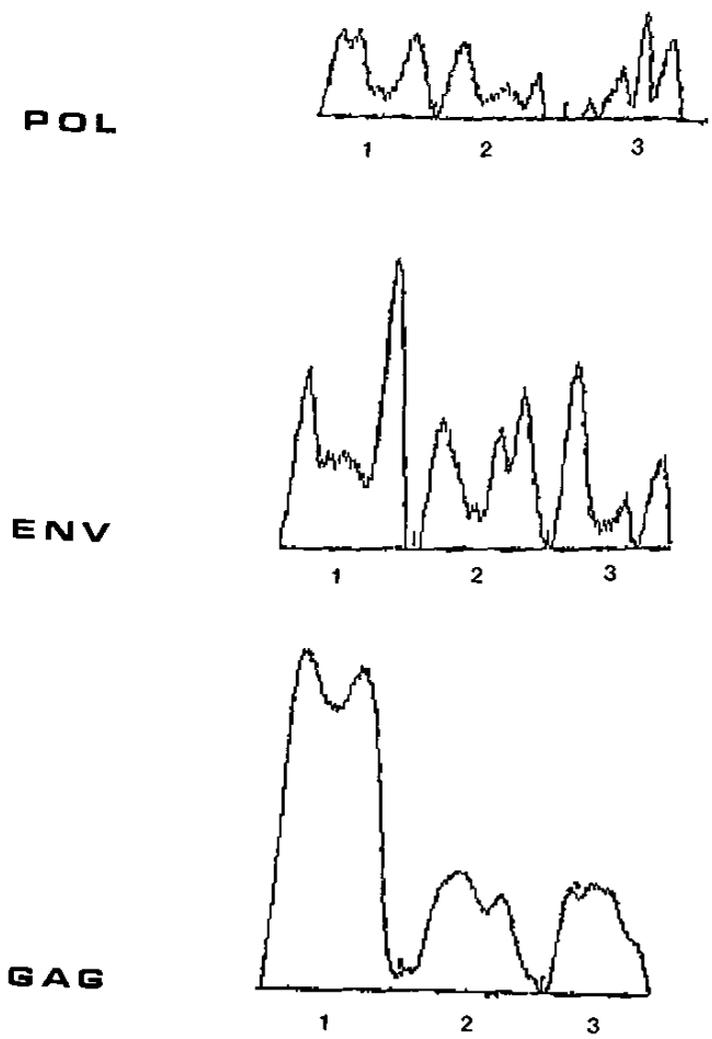
En este análisis se observó que en la vaca No. 9 no se presenta disminución en los productos de RT-PCR de los genes constitutivos con el tratamiento de plasma autólogo como se observó en las células FLK-BLV y en las CM de la vaca No. 8 ( figura No. 22 ). La figura No. 23 presenta un rearrreglo de la figura No. 22 con el objeto de hacer una mejor comparación de la intensidad de las bandas. Se observa en el gen GAG mayor intensidad de las bandas en todos los tratamientos con respecto a los genes POL y ENV. En el tratamiento con suero autólogo se observa mayor intensidad de la banda con respecto al control en los genes GAG y ENV, mientras que en el gen POL se observa la intensidad igual que en el control, (**Fig.24**).



**FIGURA 22.-** RT-PCR DE LOS GENES GAG, POL Y ENV DE BLV DE CM INFECTADAS DE LA VACA No. 9 CULTIVADAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS. Línea 1.- 20% de suero autólogo, 2.- 20 % de SFB, 3.- 20% de plasma autólogo.



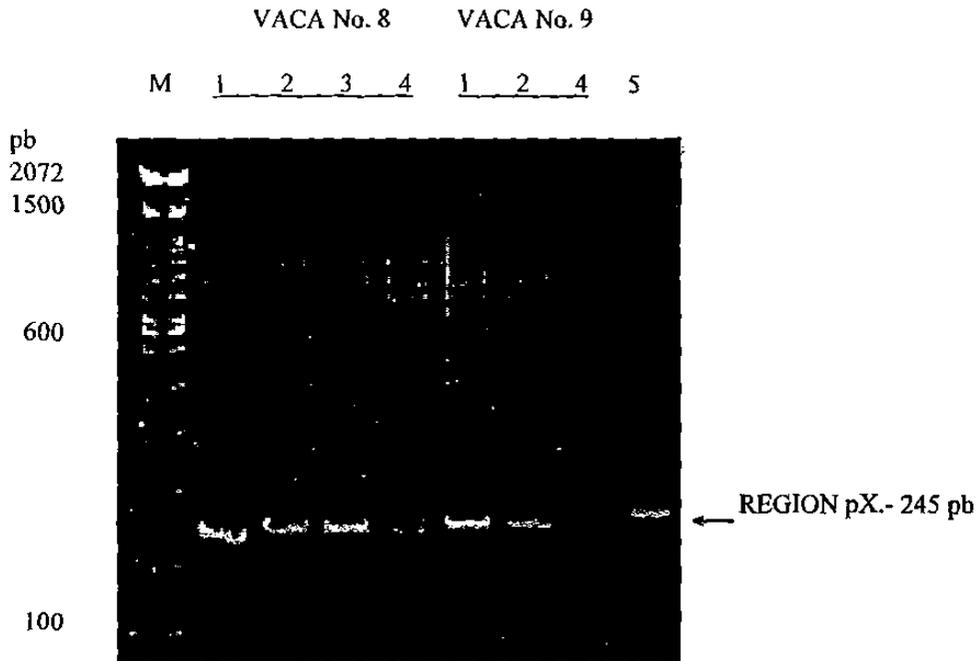
**FIGURA 23.-** REARREGLO DETALLADO. RT-PCR DE LOS GENES CONSTITUTIVOS DE BLV DE CM INFECTADAS DE LA VACA No. 9 CULTIVADAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS. 1.- 20% de suero autólogo 2.- 20 % de SFB. 3.- 20% de plasma autólogo.



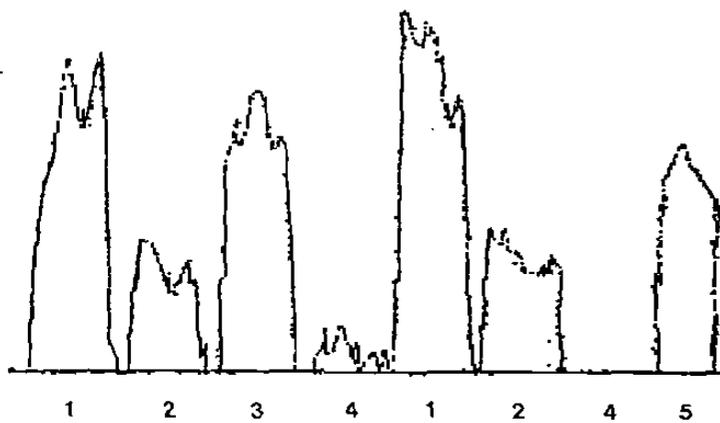
**Figura 24.-** Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR de los genes constitutivos de BLV en CM de la vaca No. 9 . 1.- 20% suero autólogo, 2.- 20% suero fetal bovino, 3.- 20% plasma autólogo.

### **3.- DETECCION DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE RNAm DE LA REGION pX DE BLV POR RT-PCR**

Se analizó el efecto de los tratamientos sobre los niveles de expresión de la región pX del virus BLV en CM infectadas de las vacas Nos. 8 y 9. En la figura No. 25 se observa el patrón electroforético de los productos de amplificación de la región pX donde se muestra que en las células tratadas con plasma ( carril 4 de vaca No. 8 y 7 de vaca No. 9 ) una fuerte disminución a niveles no detectables en la vaca No. 9 en la intensidad de la banda con respecto a los otros tratamientos, lo cual representa una inhibición de la expresión con plasma autólogo, mientras que en los tratamientos con suero autólogo e IgG se observa mayor expresión con respecto al control ( carril 1, 3 y 5 ). Ver el patrón de densitometría del electroforetograma de la figura 25 ( figura 26 ).



**FIGURA 25.- RT-PCR DE LA REGION pX DE BLV EN CM INFECTADAS DE LAS VACAS Nos. 8 y 9 CULTIVADAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS.1.- 20% de suero autólogo, 2.- 20 % de SFB, 3.- 150 µg/ml de IgG 4.-% de plasma autólogo. 5.- PCR de DNA de CM infectadas. (control +).**



**Figura No. 26.- Perfil de densitometría de los electroforetogramas de productos de RT-PCR de la región pX en CM de las vacas No. 8 y 9 . 1.- 20% suero autólogo, 2.- 20% suero fetal bovino, 3.- 150 µg/ml de IgG bovina y 4.- 20% plasma autólogo. 5.- control +.**

En la tabla No. 4 y 5 se resumen los resultados obtenidos de los electroforetogramas de los productos de RT-PCR de, POL, ENV, GAG y pX en CM infectadas y células FLK-BLV. Tanto en células FLK-BLV como en CM de la vaca No. 8 con tratamiento de plasma se observa disminución de la expresión en todos los genes con respecto al control, mientras que en la vaca No. 9 solamente se observa ligera disminución de los niveles de expresión en el gen POL. En general con suero autólogo se observa mayor o igual expresión que el control excepto en el gen ENV de células FLK-BLV. Con respecto al tratamiento con IgG los resultados fueron muy variables. En la tabla No. 6 se resume más detalladamente los resultados de expresión del gen regulador pX, se observa una marcada inhibición de la expresión con plasma autólogo y un aumento con suero autólogo en todos los casos.

TABLA 4.- Expresión de los genes constitutivos y de regulación del BLV en la línea celular FLK-BLV.

GEN	LINEA CELULAR			
	FLK-BLV			
	SFB	SA	PA	IgG
POL	+++	+++	+	++++
ENV	+++	++	++	+++
GAG	+++	++++	+	+++
PX	+++	++++	+	+++

Valores estimativos según la intensidad de la expresión de los genes: 0- No expresión, +- Pobre expresión, ++- Expresión ligeramente menor al control, +++- Expresión igual al control, ++++.- Expresión ligeramente mayor al control, +++++.- Expresión mayor al control.

Tabla 5.- Expresión de los genes constitutivos y de regulación del BLV en CM infectadas.

GEN	CELULAS MONONUCLEARES							
	VACA No. 8				VACA No. 9			
	SFB	SA	PA	IgG	SFB	SA	PA	IgG
POL	+++	+++	+	+++	+++	+++	++	ND
ENV	+++	++++	+	++	+++	++++	++	ND
GAG	+++	+++	+	++	+++	++++	+++	ND
PX	+++	++++	+	++++	+++	++++	0	ND

Valores estimativos segun la intensidad de la expresión de los genes: 0- No expresión, +- Pobre expresión, ++- Expresión ligeramente menor al control, +++- Expresión igual al control, ++++.- Expresión ligeramente mayor al control, +++++.- Expresión mayor al control.

Tabla 6.- Expresión de la región pX de BLV en la línea celular FLK-BLV y en CM infectadas.

REGION	LINEA CELULAR	CELULAS MONONUCLEARES	
		VACA No. 8	VACA No. 9
pX	FLK-BLV		
SFB	+++	+++	+++
SA	++++	++++	++++
PA	+	+	0
IgG	+++	+++	ND

Valores estimativos segun la intensidad de la expresión de los genes: 0- No expresión, +- Pobre expresión, ++- Expresión ligeramente menor al control, +++- Expresión igual al control, ++++.- Expresión ligeramente mayor al control, +++++.- Expresión mayor al control.

## DISCUSION

Se han realizado algunos estudios sobre los factores intracelulares y extracelulares involucrados en los mecanismos de regulación génica de los retrovirus los cuales determinan la latencia viral, sin embargo poco es conocido a cerca de este evento. En este estudio analizamos “in vitro” el efecto del plasma de animales infectados como fuente del factor bloqueador de la expresión de BLV (15,16) y la IgG y el suero de animales infectados con BLV como factores de estimulación de la expresión del virus (58). En los diferentes estudios realizados sobre el factor de plasma que bloquea la expresión de BLV ( FBP ) se ha determinado por los métodos de ELISA e IET la inhibición de la producción de p24, han escogido esta proteína viral debido a que su producción en cultivo es 10 veces más grande que las otras proteínas virales (4, 53, 57 ) y por otro lado se ha analizado la expresión de RNAm virales por el método de hibridación de dot-blot (16 ). Hasta el momento no se ha reportado si el efecto inhibitorio de FBP se ejerce sobre la expresión del gen regulador ( región pX), del gen POL y/o de otros genes estructurales. Nosotros en este estudio utilizamos métodos de mayor sensibilidad como el RT-PCR y la IET para abordar este problema. Para analizar los efectos de FBP y del factor estimulador en CM infectadas nosotros seleccionamos los animales utilizando las pruebas serológicas de IDAG, ELISA e IET y se observó en 7/10 animales una correlación con los resultados obtenidos con la prueba de PCR. El animal No. 5 el cual fue seropositivo no presentó amplificación por PCR, es posible que en este caso el DNA genómico no se encuentre en linfocitos en circulación sino que este

secuestrado en algunos tejidos, o bien que sea una respuesta inmunológica a una infección abortiva (38). Los bovinos 4 y 6 dieron una prueba positiva por IDAG y por IET y fueron seronegativos por ELISA , sin embargo se detectó el provirus por PCR, lo que sugiere un resultado falso positivo por ELISA. Los efectos del FBP y del factor estimulador se analizaron sobre CM de animales cuyas pruebas serológicas y PCR fueron positivas en su totalidad lo que evita en cierta medida la existencia de variedades del virus que no hubieran podido ser detectadas por algunos de los métodos probados.

En este trabajo se observó una fuerte disminución en la expresión del gen GAG (el cual codifica para la proteína p24 ) en células FLK-BLV tratadas con plasma ( de animales seropositivos ). Hasta el momento no se tienen datos en la línea celular FLK-BLV, sin embargo en investigaciones previas en CM de vacas con LP cultivadas con plasma se ha observado un bloqueo de la síntesis de la proteína p24 (15,16,57,58). También se han realizado estudios en células de origen bovino ( CEHC, células embrionarias de carnero ) y no bovino ( CCL88, células de pulmón de murciélago ) las cuales son altamente sensibles a la infección por BLV y se ha demostrado el efecto bloqueador de FBP (16 ). En un estudio realizado con la línea celular NBC-13 (células linfoides neoplásicas, infectadas permanentemente con BLV) se observó que las fracciones con actividad bloqueadora de la expresión de BLV en plasma y fluido linfático no inhibieron la expresión de la p24 ( 57 ). Esto sugiere que la línea celular FLK-BLV así como las células CEHC y CCL88 infectadas es un sistema indicador confiable para detectar el efecto inhibitorio del FBP a diferencia de la línea celular NBC-13 y ofrece ventajas como sistema para el

estudio de FBP en comparación a las células CEHC y CCL88 debido a que la línea celular FLK-BLV se encuentra permanentemente infectada. En este trabajo se obtuvo una marcada inhibición de p24 en el cultivo de CM de los 2 animales probados tratados con plasma y una ligera disminución en la concentración de Gp51 en la vaca No. 9, esto por un lado confirma los resultados de trabajos anteriores y por otra parte sugiere un efecto inhibitorio sobre Gp-51 "in vivo". Gupta y col en 1984 observaron por inmunofluorescencia que la síntesis de Gp-51 en cultivo de células CEHC fue completamente inhibida por plasma seropositivo pero no por plasma seronegativo mientras que el derivado de suero no bloqueó la expresión del virus ( 16 ), estos resultados son similares a los encontrados en este trabajo en las células FLK-BLV y en CM tratadas con plasma donde se encontró niveles bajos de expresión en Gp-51 y p24 por IET. En el mismo trabajo Gupta y col. reportaron un efecto inhibitorio del plasma sobre RNAm virales totales, en este estudio se monitoreó el efecto del plasma sobre la expresión específica de los genes virales POL, pX, ENV y GAG. Consideramos que uno de los hallazgos más importante de este trabajo fue demostrar el efecto de bloqueo en la región pX la cual codifica para las proteínas transactivadoras tax/rex que regulan la transcripción del virus y se ha observado que juegan un papel muy importante en la patogénesis (39,49,55). En animales asintomáticos y con LP el gen pX se encuentra expresado, y está sobre-expresado en animales neoplásicos y en la línea celular FLK-BLV, esto sugiere que estos genes juegan un papel muy importante en el inicio y mantenimiento de un estado neoplásico (17), nosotros en este trabajo observamos una inhibición total o cuando menos a niveles no detectables por PCR en la expresión de este gen

en cultivo de CM de animales infectados y una disminución evidente en las células FLK-BLV ambas cultivadas con plasma ( de animales seropositivos ). Por otra parte tampoco había sido reportado el efecto del FBP sobre la expresión del gen POL en cultivos celulares ni de su status transcripcional in vivo, en este trabajo se observó que el gen POL fue uno de los genes constitutivos más afectados por el FBP tanto en las células FLK-BLV como en CM de las vacas probadas. Los genes POL y pX, genes encargados de la integración del provirus y de la regulación génica respectivamente se encontraron inhibidos en su expresión parcial o totalmente en los tratamientos con plasma en células FLK-BLV y en cultivos de CM lo cual sugiere que los factores de plasma bloquean los mecanismos de regulación viral, además al inhibir pX se inhibe también la actividad transactivadora sobre genes celulares involucrados en la neoplasia y por otro lado se bloquean los mecanismos de integración viral a la célula debido a la inhibición por POL.

Por otra parte con respecto a la expresión del RNAm viral del gen ENV se observó disminución con los tratamientos de plasma y suero autólogo en células FLK-BLV, en CM del bovino N. 8 se observó una clara disminución con plasma, mientras que en el bovino No. 9 no fue tan clara la disminución, en este caso el efecto inhibitorio con plasma no se vió reflejado en los niveles de concentración de Gp-51 por IET probablemente porque se necesita más tiempo de cultivo con este tratamiento. Por otro lado en las células FLK-BLV y CM de la vaca No.8 la expresión del gen GAG fue claramente disminuida con plasma, sin embargo en la vaca No. 9 se observó una expresión igual que el control, posiblemente la variación de los resultados en la expresión con plasma de ambos bovinos se deba como lo describe Zandommeni a que existe

expresión del virus durante el tiempo que transcurre desde el momento de la purificación de las CM hasta que se realizó el cultivo con plasma (57), a factores que son liberados por plaquetas (54) o bien por pequeñas cantidades de IgG presentes en el plasma los cuales estimulan la expresión del virus (58). Por otra parte estos resultados obtenidos en nuestro estudio nos permite sugerir que en la vaca No. 9 no ha transcurrido el tiempo suficiente para observar inhibición como consecuencia de inhibición de POL y quizá pX ( inhibición indirecta ).

Se ha demostrado que el plasma y fluido linfático tienen factores de estimulación semejante a la IgG que en bajas concentraciones estimula la expresión de p24 de BLV (57). En este trabajo se observó el efecto estimulador del suero autólogo sobre la expresión de ENV, GAG y pX en las CM y sobre GAG y pX en células FLK-BLV, se pensaba que la IgG del suero era la causante directa de la estimulación, sin embargo se encontró con IgG una aparente estimulación en POL en células FLK-BLV, y en pX en CM. Esto sugiere la existencia de otro(s) factor(es) estimulador(es) en suero además de IgG.

Zandomeni y col. observaron altos niveles de expresión de p24 de BLV en cultivos de linfocitos de bovinos con IgG anti BLV y anti-HTLV y un ligero aumento en la expresión en linfocitos humanos infectados con BLV y cultivados con IgG anti-HTLV purificada con columnas de afinidad (58). En este estudio observamos aumento de Gp-51 en células FLK-BLV y en CM cultivadas, tanto con IgG como con suero autólogo y de p24 en células FLK-BLV, sin embargo no se observó incremento en la concentración de p24 en

CM cultivadas con estos tratamientos, probablemente a un tiempo mayor de incubación con el tratamiento aumente la concentración de la proteína ya que en la vaca No. 9 se observó un aumento sobre los transcritos del gen GAG.

Takeda y col. atribuyen a la IgG el incremento de la replicación viral de HIV (52), la posibilidad de que la IgG estimula la penetración viral a sido estudiada, la cual puede contribuir a una infección in vivo (23). Con los resultados obtenidos con IgG en este trabajo se podría pensar que no hay un aumento en la penetración viral debido a que no hay un incremento en la expresión de los genes estructurales con respecto a los cultivos controles.

Ha sido sugerido que los factores estimulatorios del suero contribuyen a los inicios de un estado pre-leucémico en la fase inicial de infección y refuerzan el postulado de que bajos títulos de anticuerpos anti-BLV y la ausencia de factores bloqueadores en las fases iniciales de la infección pueden despertar una fuerte diseminación viral en el hospedero ( 58 ). Basándonos en nuestros resultados y los referidos en la literatura podemos pensar que al aumentar los títulos de anti-BLV y los factores bloqueadores se llegaría a un estado de persistencia viral el que se podría romper en el caso de que los factores bloqueadores disminuyeran con el consecuente aumento de expresión de pX conduciendo a un estado neoplásico.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se observó el efecto de los factores bloqueadores y estimuladores presentes en plasma y suero sobre la transcripción del genoma viral y síntesis de proteínas en las células FLK-BLV y cultivos de células mononucleares de bovinos infectados. Los resultados obtenidos nos permiten concluir los siguientes puntos:

- 1.- Los factores presentes en plasma reducen la expresión de los genes de BLV en la línea celular infectada permanentemente con el virus FLK-BLV.
- 2.- El gen constitutivo POL que codifica para la transcriptasa reversa fue afectado en su expresión por los factores en plasma en las células FLK-BLV y en células mononucleares de vacas infectadas con el BLV.
- 3.- La expresión de los genes de regulación pX es inhibida en presencia de los factores de plasma en células mononucleares y reducida en la línea celular FLK-BLV.
- 4.- El suero autólogo incrementa la expresión de los genes pX tanto en la línea celular FLK-BLV como en células mononucleares.
- 5.- La IgG estimula la expresión del gen POL en células FLK-BLV y pX en células mononucleares.
- 6.- Los factores de plasma y suero autólogo afectan preferentemente los genes virales encargados de la regulación de la transcripción (pX) y de la transcripción inversa.

## **PERSPECTIVAS**

La transcriptasa reversa es fundamental para la formación de DNA viral y es importante para que éste se pueda integrar al genoma celular y por otra parte las proteínas pX son requeridas para la regulación del genoma viral e inicio y mantenimiento de un estado neoplásico por la interacción con un gran número de genes de regulación del crecimiento celular, por lo que es importante determinar en forma más detallada el papel que juegan los factores bloqueadores y de estimulación en la expresión de estos genes. Además los resultados obtenidos en este trabajo nos permite plantear la posibilidad de que los períodos prolongados de latencia de los retrovirus subtipo E se deba al bloqueo principalmente de estos dos genes evitando una infección a nuevas células y una posible reinfección y por lo tanto el deterioro físico del paciente.

Es importante determinar la forma como la IgG contribuye al incremento de la expresión viral en células no linfoides, se ha observado que la IgG contribuye a la penetración viral en HIV y en algunas cepas de parvovirus de vison, sin embargo el mecanismo de acción sobre las células FLK-BLV parece ser diferente de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la expresión viral observada, sin embargo no se cuantificó el número de provirus antes y después del tratamiento.

Este estudio nos permite contribuir al entendimiento de los factores extracelulares involucrados en los mecanismos de regulación génica y patogenesis viral.

## LITERATURA CITADA

1. Ban, J., E. Gieciova, O. Orlik and C. Altaner. 1990. Use of monoclonal antibodies in an ELISA for the diagnostic of bovine leukemia virus infection. *J. Virol. Meth.*30:79-88.
2. Brandon, R. B., H. Naif, R.C.W. Daniel, M. F. Lavin. 1991. Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*50:89-94.
3. Burrige, M. J., 1981. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. *JAVMA.* 179:704-707.
4. Chatterje, R., P. Gupta, S.V.S. Kashmiri & J.F. Ferrer 1985. Phytohemagglutinin activation of the transcription of the bovine leukemia virus genome requires of novo protein synthesis. *J. Virol.* 54:860-863.
5. Chomezynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 51:532-535
6. Cowley, J. A., J. B. Molloy, C. K. Dimmock, P. J. Walker, A.G.Bruyeres & W. H. Ward. 1992. Infectivity of bovine leukaemia virus infected cattle: An ELISA for detecting antigens expressed in in vitro culture lymphocytes. *Vet. Microbiol.* 30:137-150.
7. Curtis, A. H., H. K. John.. 1988. A Modified Method of DNA Extraction From Peripheral Blood and Bone Marrow Specimens. *Amer. J. Hemat.* 28:176-180.
8. Derse, D., S. J. Caradona & J. M. Casey 1985. Bovine Leukemia Virus long terminal repeat: a cell type specific promoter. *Science.* 227: 317-320.

9. Derse, D., Diniak J. M., Casey J. M., Deininger P.I. 1985. Nucleotide sequence and structure of integrated Bovine Leukemia Virus long terminal repeat. *Virology*. 141:162-166.
10. Derse D. 1988. Trans-acting regulation of bovine leukemia virus mRNA Processing. *J. Virol.* 1115-1119.
11. Ferrer, J. F., C.Cabradilla. 1981. Use of a Feline cell line in the syncytia infectivity assay for the detection of Bovine Leukemia Virus Infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 42:9-13.
12. Ferrer J.F. 1979. Bovine Leukosis: Natural transmission and principles of control. *JAVMA*.175: 1281-1285.
13. Graves, C. D., A. D. Clement, J. F. Ferrer. 1977. A Reverse Transcriptase Assay for Detection of the Bovine Leukemia Virus. *Am. J. Vet. Res.* 38:1739-1744.
14. Grover, Y. P. & B. Guillemain. 1992. An Immunoblotting Procedure for Detection of Antibodies against Bovine Leukemia Virus in Cattle. *J. Vet. Med.* 39:48-52.
15. Gupta, P., F. Ferrer. 1981. Expression of bovine leukemia virus genome is blocked by a nonimmunoglobulin protein in plasma from infected cattle. *Sci.* 215: 405-407.
16. Gupta, P., S. V. S. Kashmiri & J. F. Ferrer. 1984. Transcriptional Control of the Bovine Leukemia Virus Genome: Role and Characterization of a Non-Immunoglobulin Plasma Protein from Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. *J. Virol.* 50:267-270
17. Haas, L., T. Divers & J.W. Casey. 1992. Bovine Leukemia Virus Gene Expression In Vivo. *Am. Soc. Microbiol.* 66:6223-6225.

18. Haynes, B., S. Miller, T. J. Palker, J. O. Moore, P. H. Dunn, D. P. Bolognesi & R. S. Metzger. 1983. Identification of human T- cell leukemia virus in a Japanese patient with adult T-cell leukemia and cutaneous lymphomatous vasculitis. *Proceed. of the Nat. Acad. of Sci., U.S.A.* 80: 2054-2058.
19. Henry, E. T., J. F. Levin, D. Coggins. 1987. Rectal transmission of Bovine Leukemia Virus in cattle and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 48:634-636.
20. Hoss, H. E. & C. Olson. 1974. Infectivity of Bovine C-type ( leukemia ) virus for sheep and goats. *Am. J. Vet. Res.* 35: 633-637.
21. Jensen, W.A., J. Rovnak & G. L. Cockerell. 1991. In Vivo Transcription of the Bovine Leukemia Virus tax/rex Region in Normal and Neoplastic Lymphocytes of Cattle and Sheep. *J. Virol.* 65:2484-2490.
22. Johnson, D. A., J. W. Gautsch, J. R. Sportman & J. H. Elder. 1984. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.* 1: 3-8.
23. Hiroyuki, K., B. W. James, E. B. Marshall. 1993. Aleutian Mink Disease Parvovirus Infection of Mink Macrophages and Human Macrophage Cell Line U937: Demonstration of Antibody-Dependent Enhancement of Infection. *Am. Soc. Microbiol.* 67:7017-7024.
24. Kettmann, R., J. Deschamps, Y. Cleuter, D. Covez, A. Burney & G. Marbaix. 1982. Leukemogenesis by Bovine Leukemia Virus: Proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:2465-2469
25. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227: 680-685.

26. Lagarias, M. D. & K. Radke. 1989. Transcriptional Activation of Bovine Leukemia Virus in Blood Cells from Experimentally Infected, Asymptomatic Sheep with Latent Infections. *J. Virol.* 63:2099-2107.
27. Larios, G. E. y M. B. Monroy. 1985. Complejo leucosis-linfosarcoma. Estudio epidemiológico en bovinos pardo-suizo. Primera Conferencia Internacional sobre ganado lechero. México, D. F.
28. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
29. Mamoun, R. Z., T. Astier, B. Guillemain & J.F. Duplan. 1983. Bovine Lymphosarcoma: Expression of BLV-related Proteins in Cultured Cells. *J. Gen.* 64: 1895-1905.
30. Mamoun, R. Z., T. Astier-Gin, R. Kettmann, J. Deschamps, N. Rebeyrotte & B. J. Guillemain. 1985. The px region of the Bovine Leukemia Virus is transcribed as a 2.1 kilobase mRNA. *J. Virol.* 53: 625-629.
31. Matsuda, S., M. Gidlund, F. Chiodi. 1989. Enhancement of human immunodeficiency virus (HIV) replication in human monocytes by low titers of anti-HIV antibodies in vitro. *Scand. J. Immunol.* 30:425-434.
32. Miller, J. M. & M. J. Van Der Maaten. 1977. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for Bovine Leukemia Virus antibodies. *Europ. J. Can.* 13: 1369-1375.
33. Miller, J. M. 1988. Cultivation methods for production of Bovine Leukemia Virus and soluble viral antigens. *J. Tissue Culture Methods.* 11:65-69.

34. Miller, J. M., M. J. F. Schemerr, M. J. Van Der Maaten. 1981. Comparison of four serologic test for the detection of antibodies to Bovine Leukemia Virus. *Am. J. Vet. Res.* 42:5-8.
35. Mirsky, M.L., Y. Da & H.A. Lewin. 1993. Detection of Bovine Leukemia virus Proviral DNA in Individual Cells. *PCR Methods and Application.* 2:333-340.
36. Molloy, J.B., C.K. Dimmock, F.W. Eaves, A.G. Bruyeres, J.A. Cowley, W.H. Ward. 1994. Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of infected cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures. *Vet. Microbiol.* 39: 323-333.
37. Monroy, B. J., T. F. Trigo, G. F. Lanus, M. R. Fajardo, M. R. Marquez. 1985. Estudio seroepidemiológico de leucosis bovina en México. *Primera Conferencia Internacional sobre ganado lechero.* México, D. F.
38. Murtaugh, M. P., G. F. Lin, D. L. Haggard, A.F. Weber & J. C. Meiske. 1991. Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 33:73-85.
39. Nerukar, L.S., F. Wong-Staal & R.C. Gallo. 1990. Human retroviruses, leukemia and AIDS. In *Leukemia*, 5th edn. 225-252.
40. Nielsen, S. B., E. Piper Charles, J. F. Ferrer. 1978. Nature mode of transmission of Bovine Leukemia Virus: Role of Bloodsucking insects. *Am. J. Vet. Res.* 3:1089-1092.
41. Okada, K., H. Yohei, A. Yoko & O. Kan-Ichi. 1991. In situ Hybridization for the Demonstration of Bovine Leukemia Virus Transcripts in

- Lymphosarcoma Cells Using Biotinylated Probes. *J. Vet. Med.*38:707-713.
42. Olson, C., J. M. Miller, L. D. Miller, K. G. Guillette. 1970. C-Type virus and lymphocytic nuclear projections in bovine lymphosarcoma. *J.A.V.M. A.* 156:1880-1883.
43. Olson, C., H. E. Hoss, J. M. Miller, L. E. Baumgartener. 1973. Evidence of bovine C-type ( Leukemia ) Virus in Dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 34:355-357.
44. Rice, R. N., R. M. Stephens, A. Burney & R. V. Gilden. 1985. The gag and pol genes of Bovine Leukemia Virus: Nucleotide sequence and analysis. *Virology* 142:357-377.
45. Sagata, N., T. Yasunaga , Y. Ogawa, J. Tsuzuku -Kawamura & Y. Ikawa. 1984. Bovine leukemia virus: Unique structural features of its long terminal repeats and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4741-4745.
46. Sagata, N., T. Yasunaga, J. Tsuzuku-Kawamura, K. Ohishi, Y. Ogawa & Y. Ikawa. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:677-681.
47. Sagata, N., J. T. Kawamura, M. N. Aida, F. Shimizu, K. Imagawa & Y. Ikawa. 1985. Identification and some biochemical properties of the major XBL gene product of Bovine Leukemia Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:7879-7883

48. Sagata, N., T. Yasunaga & Y. Ikawa. 1985. Two distinct polypeptides may be translated from a single spliced mRNA of the X genes of human T-cell Leukemia and Bovine Leukemia Virus. *F. E. B. S.* 192:37-42.
49. Shcupbach, J. 1989. Human retrovirology: facts and concepts. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 142: 1-115.
50. Sherman, M. P., G. D. Ehrlich, J. F. Ferrer, J. J. Sninsky, R. Zandomeni, N. L. Dock & B. J. Poiesz. 1992. Amplification and Analysis of Specific DNA and RNA Sequences of Bovine Leukemia Virus from Infected Cows by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:185-191.
51. Stott, M.L., M. C. Thurmond, S. J. Dunn, B. I. Osburn & J. L. Stott. 1991. Integrated bovine leukosis proviral DNA in helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. *J. General Virology.* 72:307-315.
52. Takeda, A., C.V. Tuazon, F.A. Ennis. Antibody-enhanced infection by HIV-I via Fc receptor-mediated entry. 1988. 242: 580-583.
53. Taylor, J.A. & R.M. Jacobs. 1993. Effects of Plasma and Serum on the In vitro Expression of Bovine Leukemia Virus. *Lab. Invest.* 69: 340-345.
54. Tsukiyama, K., M. Onuma & H. Izawa. 1987. Effect of platelet-derived factor on expression of bovine leukemia virus genome. *Arch. Virol.* 96:89-96.
55. Yoshida, M. 1987. Expression of the HTLV-I genome and its association with a unique T-cell malignancy. *Biochimica et biophysica acta.* 907:145-161.
56. Yoshinaka, Y., K. Iyoko, D. C. Terry, S. W. Gary & O. Stephen. 1986. Bovine Leukemia Virus Protease: Purification, Chemical Analysis, and In Vitro Processing of gag Precursor Polyproteins. *J. Virol.* 57:826-832.

57. Zandomeni, R.O., M. Carrera-Zandomeni, E. Esteban, W. Donawick & J. F. Ferrer. 1992. Induction and inhibition of bovine leukaemia virus expression in naturally infected cells. *J. General Virol.* 73:1915-1924.
58. Zandomeni, R.O., E. Esteban., M. Carrera-Zandomeni, & J. F. Ferrer. 1994. Host soluble factors with bloking and stimulating activity on the expression of the bovine leukemia virus. *J. Infec. Dis.* 170: 787-794.
59. Zapata, B. P., L. Trejo, R. Avalos, A. Lara, R. Tamez, A. Beltrán. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la leucosis bovina en 22 municipios de la región noreste de México. Aceptado para publicación . *Rev. Vet. México.* En prensa.

## APENDICE

### PREPARACION DE REACTIVOS UTILIZADOS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Acrilamida-Bisacrilamida 30%.-** Disolver 29 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida en 50 ml de agua bidestilada y aforar a 100 ml. Filtrar en membrana milipore de 0.45 mm. Almacenar a 4°C en un recipiente cubierto con papel aluminio.

**Agarosa 0.8% en solución balanceada de TAE.-** Disolver 0.81 g de agarosa en 99 ml de solución TAE.

**Agarosa 0.8 % para inmunodifusión.-** Disolver 0.8 g de agarosa en solución balanceada de Tris-HCl 50 mM pH 7.2 con 8.5% de NaCl.

**Alfa-metil-D-manosidasa ( AMDM ).-** Disolver 19.42 g de AMDM en 800 ml de agua bidestilada y aforar a un litro.

**Alcohol etílico 70%.-** Mezclar 700 ml de etanol absoluto y 300 ml de agua bidestilada, almacenar en refrigeración.

**Azul de Coomassie 0.25%.-** Disolver 0.25 g de azul de coomassie en 40 ml de metanol, 10 ml de ácido acético glacial y 50 ml de agua bidestilada, almacenar a temperatura ambiente.

**Bromuro de Etidio 0.5mg/ml.-** Disolver 50 mg de bromuro de etidio en 80 ml de agua bidestilada y aforar a 100 ml, almacenar a 4°C en un recipiente ambar para protegerlo de la luz, de esta solución se hará una dilución de 1:1000 para teñir los geles.

**Bicarbonato de sodio 4.4%.-** Depositar 500.0 ml de agua bidestilada en un frasco limpio y seco, agregar 44.0 g de bicarbonato de sodio, agregar 0.5 ml de rojo fenol 1%, aforar a un litro, añadir 10 g de bióxido de carbono sólido, agitar constantemente hasta que el indicador vire a color canela pálido ( pH- 7.1- 7.3 ). Esterilizar en autoclave a 110°C durante 20 min.

**Cloruro de sodio 8.5%.-** Disolver 85 g de NaCl en 500 ml de agua destilada y aforar a un litro.

**Cloruro de sodio 9%.-** Disolver 9 g de NaCl en 500 ml de agua destilada y aforar a un litro.

**Formaldheído 0.1%.-** Adicionar 270 µl de formaldheído al 35%, aforar a 100 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

**Fenol saturado.-** El fenol que se va a destilar se puede recibir en un pequeño volumen de Tris-Hcl 1M para evitar su cristalización, para la saturación siga los siguientes pasos:

- 1.- Fundir el fenol.
- 2.- Destilar ( se produce a destilar el fenol si el aspecto de este al estar fundido, no es cristalino ), el fenol destila a una temperatura de 180 °C, es recomendable no conectar agua circulante porque puede cristalizarse en el mismo refrigerante, antes de comenzar la saturación, el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 con hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% ( función antioxidante ).
- 3.- Añadir 1 volumen de solución amortiguadora Tris-Hcl 0.5M pH y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 ( medir con papel indicador ).
- 4.- Dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o un embudo de separación.
- 5.- Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora de tris-HCl 0.1 M pH8.
- 6.- Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de 0.1 m Tris-HCl pH 8 conteniendo 0.2 % de mercaptoetanol.
- 7.- La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un recipiente ambar a -20°C, las alícuotas de fenol en uso se almacenan a 4°C.

**Gel de acrilamida para RNA.-** Mezclar 3.9 g de urea, 1.45 ml de acrilamida, 1.9 ml de TBE 5X, 0.1 ml de PSA, 5 µl de TEMED y 3.25 ml de agua bidestilada

**Hidróxido de sodio ( NaOH ) 1 N.-** Disolver 40 g de NaOH anhidro en agua bidestilada y aforar a 1 litro.

**Jugo azul 6X ( contiene 0.25% de azul de bromofenol, 0.25 % de xilencianol y 30 % de glicerol ).-** Mezclar 20 mg de xilencianol, 25 de azul de bromofenol y 3.0 ml de glicerol, aforar a 10 ml con agua bidestilada.

**Lauril sulfato de sodio (SDS) 10 %.-** Disolver 10 g de SDS en 90 ml de agua bidestilada.

**Medio esencial minimo de crecimiento ( MEMC).-**Tomar 50 ml de SSMEM y despositarlos en un frasco de 100 ml, adicionar 8 ml de suero fetal bovino ( SFB ), 4 ml de bicarbonato de sodio 4.4% estéril, 100 µl de PES estéril, aforar a 100 ml con agua tridestilada estéril. Para la preparación del medio esencial minimo de mantenimiento (MEMM), tomamos lo mismo que para el MEMC solo que se le adiciona 5 ml de SFB en lugar de 8 ml.

**Medio esencial minimo para congelación (MEMF).-** Tomar 50 ml de SSMEM, depositarlos en un frasco estéril de 100 ml, adicionar 20 ml de SFB, 4 ml de bicarbonato de sodio 4.4% estéril, 100 µl de PES estéril, 10 ml de dimetil sulfoxido ( DMSO ), aforar a 100 ml con agua tridestilada estéril..

**Medio RPMI-1640 de crecimiento (MRC).-** Tomar 50 ml de SSMR y despositarlos en un frasco de 100 ml, adicionar 10 ml de suero fetal bovino ( SFB ), 4 ml de bicarbonato de sodio 4.4% estéril, 100 µl de PES estéril, aforar a 100 ml con agua tridestilada estéril.

**SDS 0.1 %.-** Tomar 1 ml de SDS 10% y aforar a 20 ml con agua destilada.

**SDS 1%.-** Tomar 1 ml de SDS 10% y aforar a 10 ml con agua destilada.

**Solución stock de medio esencial mínimo (SSMEM).-** Disolver 13.4 g de medio esencial DULBECOS en 200 ml de agua tridestilada, aforar a 500 ml, esterilizar por filtración con una membrana de poro 0.22  $\mu\text{m}$ , con esto tenemos una solución de medio al 2X.

**Solución stock de medio RPMI-1640 (SSMR).-** Disolver 10.4 g de medio RPMI-1640 en 200 ml de agua tridestilada y aforar a 500 ml. Esterilizar por filtración con una membrana de poro 0.22  $\mu\text{m}$ , con esto tenemos una solución de medio al 2X.

**Solución A de sulfato de cobre 5% para cuantificación de proteínas.-** Disolver 1 g de sulfato de cobre en 20 ml de agua.

**Solución B de tartrato de sodio y potasio 10% para cuantificación de proteínas).-** Disolver 2 g de NaKtartrato en 20 ml de agua.

**Solución C de NaOH 0.5 N para cuantificación de proteínas.-** Disolver 2 g de NaOH en 100 ml de agua destilada.

**Solución de Folin.-** Mezclar 1 ml de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu con 1 ml de NaOH 1 N.

**Solución de tártrato de cobre 5X.-** Mezclar las soluciones A, B y C en relación 1:1:100.

**Solución de sustrato de diaminobenzidina 0.05%.-** Disolver 20 mg de 3,3 Diaminobenzidina en 40 ml de PBS A 1X.

**Solución bloqueadora de TBS-TWEEN 2.5% para inmunodetección.-** Disolver 2.5 ml de Tween-20 con 20 ml de solución de TBS y aforar a 100 ml.

**Solución de lavado de TBS-TWEEN 0.05 % para inmunodetección en placas de ELISA y en membrana de nitrocelulosa.-** Disolver 50 µl de Tween-30 con 20 ml de solución TBS y aforar a 100 ml.

**Solución bloqueadora para ELISA TBS-TWEEN 0.15%.-** Disolver 0.15 ml de Tween-20 con 30 ml y aforar a 100 ml.

**Solución de lisis para proteínas.-** Tris-HCl pH 7.5 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 80 mM, NP-40 1% , deoxicolato de sodio 0.2%.

**Solución de lisis para DNA.-** Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 10 mM y EDTA 10 mM

**Solución de lavado tipo A para purificación de IgG.-** Disolver 7.88 g de Tris-HCl (0.5 M), 8.76 g de NaCl (0.15) M y 0.20 g de NaN<sub>3</sub> (0.02%) en

200 ml de agua destilada y aforar a un litro, la solución quedará a un pH final 8.6.

**Solución de elución tipo B para purificación de IgG.-** Disolver 37.53 g de glicina, 8.76 g de NaCl y 0.20 g de NaN<sub>3</sub> en 200 ml de agua destilada y aforar a un litro, la solución quedará a un pH final de 3.

**PBS 1X.-** Disolver en 500 ml de agua bidestilada 160 g de cloruro de sodio ( NaCl), 4 g de cloruro de potasio ( KCl ), 28.8 g de fosfato dibásico de sodio ( Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ) y fosfato monobásico de potasio ( KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ), aforar a 1 litro, esterilizar en autoclave a 110°C durante 20 minutos. Almacenar en refrigeración.

**Persulfato de amonio 10 %.-** Disolver 1 g en 9 ml de agua bidestilada, conservar a 4°C en un recipiente ambar.

**Proteinasa K 10µg/ml.-** Disolver en alícuotas de 500 µl y almacenar a -20°C.

**RNAasa libre de Dnasas 10 mg/ml.-** Disolver 100 mg de RNAasa en 9.92 ml de agua bidestilada estéril, 50 ml de Tris-HCl 2 M pH 7.5 y 30 µl de NaCl 5 M, se incuba a ebullición por 20 minutos, se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente, dividir en alícuotas y almacenar a - 20 °C.

**Rojo fenol 1%.-** Depositar 10 g de rojo fenol en un matraz de un litro, agregar 570 ml de agua destilada y 30 ml de NaOH 1 M agitar durante 2 hr a

temperatura ambiente y aforar a un litro, filtrar en papel whatman No. 2, esterilizar en autoclave a 110°C durante 10 min.

**SEVAG ( Cloroformo- isoamílico 24:1).**- Se mezclan 40 ml de alcohol isoamílico y 960 ml de cloroformo.

**Solución balanceada de tris 1.0 M.**- Disolver 121.1 g de Tris- HCl, en 300 ml de agua bidestilada y aforar a 1 litro, ajustar a pH 6.8.

**Solución balanceada de boratos 5X.**- Mezclar 54g de trizma base, 27.5 g de ácido bórico y 2 ml de EDTA 0.5 M y aforar a un litro.

**Solución decolorante.**- Mezclar 100 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial con 800 ml de agua bidestilada.

**Solución fijadora.**- Mezclar 400 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial con 500 ml de agua bidestilada.

**Solución de corrimiento para electroforesis 10X.**- Disolver en 600 ml de agua bidestilada 144.1 g de glicina, 30.2 g de tris-base y 10 g de SDS, aforar a un litro.

**Solución de muestras para electroforesis.**- Disolver 0.92 de SDS , 2ml de B- mercaptoetanol, 4 g de glicerol, 0.3 g de tris-base y 2.0 ml de azul de

bromofenol 0.1% en 10 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.8 con HCl y aforar a 20 ml.

**Solución balanceada para el gel concentrador.-** Disolver 6.055 g de tris-base y 2µl de SDS 20% en 70 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.8 con HCl y aforar a un litro.

**Solución balanceada para el gel separador.-** Disolver 18.165 g y 2 µl de SDS 20% en 70 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.8 con HCl, aforar a un litro.

**Solución de EDTA 0.05%.-** En un frasco limpio y seco mezclar 50 ml de PBS A con agua, agregar 0.5 g de EDTA, agitar hasta que se disuelva por completo y ajustar el pH a 7.6 con NaOH 1 N. Esterilizar en autoclave a 110° durante 20 min.

**Solución de penicilina-estreptomina (PES) ( concentraciones finales de 100,000UI/ml y 100,000 µg/ml ).-** Disolver 1,000,000 ( 0.6 g aproximadamente) de penicilina G ( sal disódica ) y 1 g de estreptomina dihidratada en 5.0 ml de agua destilada cada uno, mezclar las soluciones y esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

**TBE 10% (contiene Tris-Borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M).-** Mezclar 5.400.0 g de base trizma y 2750.0 g de ácido bórico en 1 litro de solución EDTA 500mM pH 8.

**TE 100 % ( contiene EDTA 100 mM y Tris-HCl 1 M ).-** Mezclar 25 ml de Tris-HCl 2 m, pH 7.5, 10 ml de EDTA 500 mM y 15 ml de agua bidestilada, esterilizar en autoclave, esta solución se usa normalmente a 1X.

