

**PEDECIBA BIOLOGÍA  
SUB-ÁREA:  
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**ASPECTOS GENÓMICOS Y EVOLUTIVOS DEL VIRUS  
DE LA LEUCOSIS BOVINA.**

**MSc. Gonzalo Moratorio**

**Tesis de Doctorado**

**Unidad de Biofísica de Proteínas  
Institut Pasteur de Montevideo**

**Laboratorio de Virología Molecular  
Centro de Investigaciones Nucleares  
Facultad de Ciencias  
Universidad de la República**

**2012**

**Orientador: Dr. Otto Pritsch  
Orientador: Dr. Juan Cristina**

# 1. Introducción General

## **1.1 La Leucosis Bovina Enzoótica.**

### **1.1.1 La Enfermedad.**

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad viral que afecta al ganado bovino y que en razón de prácticas de manejo, sanidad y producción, adquiere especial importancia en animales lecheros.

La misma, debe distinguirse de otras dos afecciones leucósicas que afectan severamente, y de forma esporádica, a la especie bovina y cuya etiología es desconocida: (i) la leucosis juvenil, en sus formas tímica o multicéntrica; y (ii) la leucosis cutánea del adulto (Toma et al., 1990).

En la mayoría de los animales infectados (60%), nunca se observan signos de la enfermedad y se convierten en portadores asintomáticos del virus, a este estado de la enfermedad se lo denomina AL, por aleucémicos. Extrañamente, un tercio del ganado infectado presenta linfocitosis persistente (PL) caracterizada por una expansión policlonal no maligna de células B CD5<sup>+</sup>. Finalmente, solo entre un 5 y 10 % de los bovinos infectados desarrollan la forma clínica linfosarcoma (LS) caracterizada por la formación de tumores que determinan el refugio, sacrificio o la muerte de los animales afectados. Es importante destacar que para el ingreso a esta etapa clínica no es necesario presentar previamente una etapa de linfocitosis persistente. (Burny et al., 1988; Kettmann et al., 1994; Llames et al., 2001).

El agente etiológico de esta enfermedad es un Retrovirus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB) perteneciente al género Deltaretrovirus. Este género incluye virus linfotrópicos de células T tanto de simio como de humanos (STLV-1, -2 y 3, y HTLV-1, 2 y 3, respectivamente), los cuales son agentes causales de leucemias de células T (Kettmann et al., 1994). Es por este motivo que existe gran preocupación ante la posibilidad de que el agente etiológico de la LBE pueda afectar al ser humano a través

de la leche. Si bien hasta el presente nunca se ha comprobado en forma fehaciente este hecho, el mismo no puede ser descartado. (Buehring et al., 2003).

La enfermedad LBE produce pérdidas directas por su presentación clínica, que en general es poco frecuente aunque en algunos establecimientos adquiere inusual relevancia. Las pérdidas económicas de las poblaciones afectadas en forma subclínica, aunque discutidas en algunas investigaciones, incluyen disminución en la producción lechera, infertilidad e incremento de refugos. En ausencia de vacunas efectivas, numerosos países han emprendido campañas de control y/o erradicación de la LBE. La más antigua y reconocida es la llevada a cabo por la Unión Europea, que eliminando mediante sacrificio a todos los animales seropositivos, ha determinado luego de muchos años, que 12 de los 15 países originales del bloque se encuentren actualmente libres de LBE. Muchos otros países poseen programas voluntarios de control, además de políticas restrictivas a la importación de animales en pié.

### **1.1.2 Historia de la LBE**

El primer intento de estudiar la LBE y caracterizarla como una entidad clínica fue entre 1871 y 1877 por Siedamgrotzky (Kettmann et al., 1994). Un siglo más tarde, se comenzó a investigar la etiología infecciosa de la LBE debido a la presentación de tumores de características transmisibles entre bovinos de un mismo rodeo donde se realizaban prácticas de inmunización que incluían la transferencia de sangre entera entre los animales (Olson, 1961). En 1969 se demostró por microscopía electrónica la presencia de un agente viral en cultivos de células mononucleares procedentes de bovinos con aumento en el recuento total de glóbulos blancos (Miller et al., 1969). Finalmente en 1970 se confirmó la naturaleza transmisible de la infección probándose que la inoculación de sangre y leche procedente de bovinos afectados era capaz de provocar tumores en bovinos y ovinos (Mammerickx, 1970). En 1972 se comprobó la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra VLB en suero de bovinos con tumores linfoides utilizando el ensayo de inmunofluorescencia (Miller y Olson, 1972), abriendo así el camino hacia los primeros estudios serológicos. Más tarde, Van Der Maaten y Miller (1976) lograron adaptar el VLB a células fetales ovinas, para derivar en

la obtención de en una línea celular de ovinos persistentemente infectada, *Fetal Lamb Kidney cells* (células FLK).

### **1.1.3 Diagnóstico de la Leucosis Bovina Enzoótica**

Los animales que presentan linfoma pueden ser detectados mediante diagnóstico clínico, pero aquellos infectados asintomáticos y/o con LP requieren de pruebas de laboratorio para realizar el diagnóstico.

La detección serológica, mediante inmuno-difusión en gel agar (IDGA) o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), de anticuerpos principalmente contra la glicoproteína gp51 de la envoltura viral, constituye el método más comúnmente usado para la identificación de animales infectados (Martín et al., 2000; González et al., 2001). Estas técnicas son reconocidas por la Organización Internacional de Epizootias (Beier, 2008) y aceptadas por la mayoría de los Gobiernos, incluido nuestro país, como pruebas oficiales para el diagnóstico de VLB.

Por otra parte, se ha descrito el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método diagnóstico directo, que detecta secuencias del gen *env*, codificante de la glicoproteína gp51 del VLB (Ballagi-Pordany et al., 1992; Felmer et al., 2006). Esta metodología también es aceptada actualmente por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) como prueba de diagnóstico de VLB, aunque en forma alternativa como prueba confirmatoria de las pruebas serológicas mencionadas anteriormente (Beier, 2008).

Se ha reportado que el método diagnóstico más sensible es la PCR, luego el ELISA, siendo IDGA la que detecta menor número de animales positivos (Fechner et al., 1996; Martín et al., 2001; Trono et al., 2001; Felmer et al., 2006; Camargos et al., 2007; Rama et al., 2010). Para el control de esta enfermedad es muy importante la unificación de criterios sobre el método diagnóstico a utilizar (Acta 84, CONAHSA, 2005), por lo que se debe conocer la sensibilidad y especificidad de los diversos métodos validados y

disponibles. Asimismo, es que varios reportes y manuales proponen para el diagnóstico de VLB la utilización de métodos serológicos en un período comprendido entre 2 semanas antes y un mes después del parto (Burrige et al., 1982; Hübner et al., 1996). Esto es debido a la detección de un mayor porcentaje de falsos negativos, utilizando IDGA como método de diagnóstico, en vacas que se encuentran cercanas al parto (Burrige et al., 1982; Hübner et al., 1996). Dicho fenómeno puede ser explicado por un descenso de los anticuerpos maternos circulantes debido al transporte de los mismos hacia la glándula mamaria, en la producción de calostro (Rama et al., 2011).

Durante muchos años las alteraciones hemáticas fueron consideradas como fase pretumoral de LBE y constituyeron la base del diagnóstico en los planes de control y erradicación de esta enfermedad. Sin embargo, con el desarrollo e introducción de IDGA, se pudieron evidenciar importantes limitaciones de sensibilidad y especificidad de las claves hematológicas, perdiéndose el interés por las alteraciones hematológicas como herramienta de diagnóstico, epidemiología y control de la LBE (Sienra et al., comunicación nacional, 1998), quienes mostraron que del conjunto de animales que presentaban leucocitosis, la mayor proporción eran VLB positivos por ELISA. Además, determinaron que los animales seropositivos tienen mayor promedio de leucocitos y linfocitos circulantes que los seronegativos, mientras que no encontraron diferencias significativas promedio con respecto a neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Por otro lado, Collazo et al. (Comunicación nacional, 2002) mostraron que la frecuencia de muestras con recuento de leucocitos totales aumentado es significativamente mayor en vacas seropositivas con respecto a sus congéneres seronegativos.

Debido a que el recuento celular de la línea blanca (recuento leucocítico diferencial, RLD) se ve afectado por otras enfermedades (no LBE), las investigaciones que tengan como fin estudiar los efectos de este virus sobre el RLD deben de registrar los eventos sanitarios de los animales.

### 1.1.4 Prevención y Control

En la actualidad no existe ningún tratamiento para la LBE, sólo es posible la prevención y/o control de la enfermedad (Radostits et al. 2002). El principio fundamental para la prevención de esta enfermedad es la correcta identificación de los animales infectados y su eliminación o segregación del rodeo (Barros y Lemos, 1998). Los programas de control basados en este principio requieren de pruebas de diagnósticas periódicas. Estos programas han sido adoptados por varios países de Europa que requieren certificado de negatividad para el ganado importado, como Dinamarca y Alemania. En otros países, incluyendo Canadá y los Estados Unidos, los programas de control no son de carácter oficial, por lo tanto son llevados a cabo de forma voluntaria (Fenner et al., 1993).

Se considera un rodeo positivo al que tienen un solo animal seropositivo, y por lo tanto la totalidad de los restantes animales debe ser testados. Los animales infectados pueden ser reemplazados por otros animales seronegativos para VLB y por lo tanto libres de LBE (Barros y Lemos, 1998). Existen procedimientos para el correcto manejo de predios de forma de disminuir la transmisión a través de la sangre contaminada; los mismos deben llevarse a cabo de forma conjunta con la correcta identificación y eliminación de animales infectados.

Entre ellos podemos mencionar:

- Desinfección de instrumentos quirúrgicos, instrumentos de tatuaje, caravanas, etc.
- El uso de guantes desechables para la palpación rectal o desinfección
- Mantener aislados del rebaño a los bovinos seronegativos (Barros y Lemos, 1998).

## 1.2 El Virus de la Leucosis Bovina (VLB)

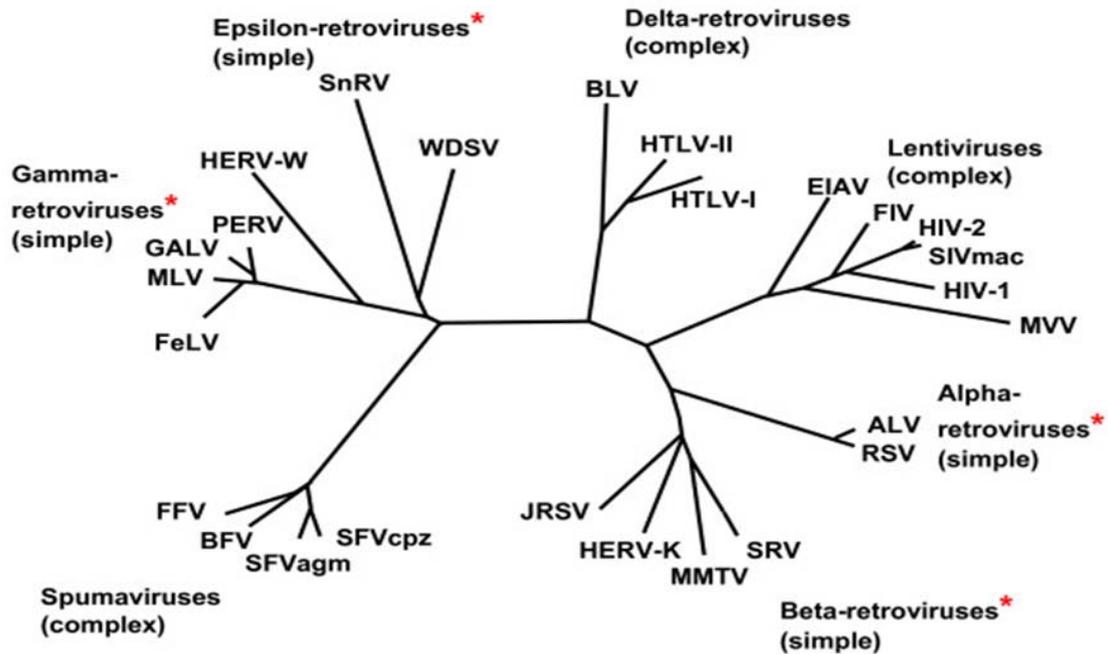
### 1.2.1 Clasificación

El VLB pertenece a la familia *Retroviridae*, y al género Deltaretrovirus (ver Figura 1), con los cuales comparte dos características particulares:

- 1) invierten el orden en el que naturalmente fluye la información genética en los sistemas biológicos, ya que son virus de ARN por lo que necesitan de una transcriptasa reversa para convertir este ARN en ADN
- 2) integran su genoma en el genoma del hospedero. Este proceso se encuentra mediado por una enzima denominada integrasa. La forma integrada de un retrovirus es denominada provirus. Los genes de este provirus son expresados por mecanismos celulares y se sintetizan así, las nuevas partículas virales

El mismo comparte su organización genómica con los virus linfotrópicos de células T de humanos (HTLV-1 y HTLV-2) y de simios (STLV-1, STLV-2 y STLV-3) (ICTVdB Management, 2006).

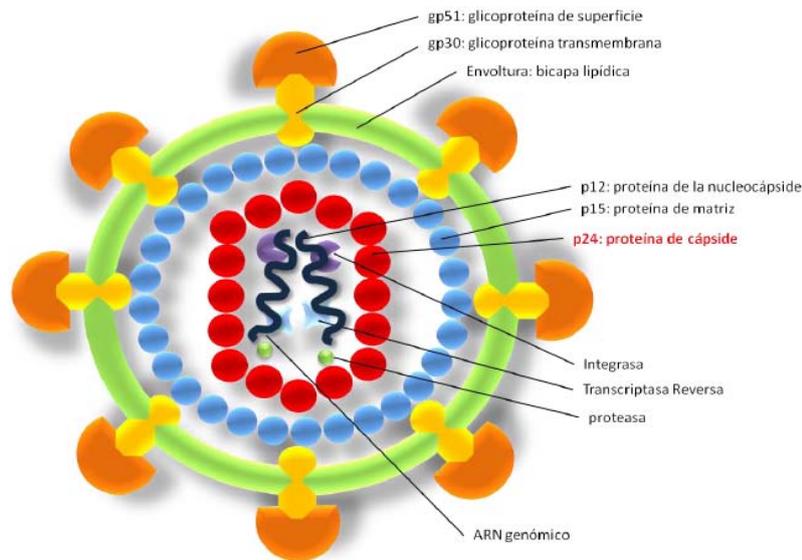
Los virus integrantes del género Deltaretrovirus son capaces de regular la expresión de sus propios genes, mediante la síntesis de proteínas reguladoras expresadas a partir de su propio genoma. Esta propiedad, conferida por una región genómica ubicada entre el gen *env* y el *LTR* 3', es compartida por todos los lentivirus que provocan inmunodeficiencia en humanos (HIV), simios (SIV), bovinos (BIV) y felinos (FIV), entre otros; y otros como el Virus de la Anemia Infecciosa Equina (EIAV), Virus de la Artritis-Encefalitis Caprina (CAEV) y Virus Visna-Maedi (VISNA); y los espumavirus, como el virus espumoso de los simios (SFV); y les confiere el nombre de "retrovirus complejos".



**Figura 1.** Árbol filogenético, en forma de estrella, en donde se representan las relaciones entre los diferentes miembros de la familia *Retroviridae*, basado en la secuencia del gen *pol* y realizado mediante el método de “neighbor-joining”. SnRV, retrovirus de serpiente; WDSV, virus del sarcoma de leucomas dérmicos; BLV, Virus de la Leucosis Bovina; EIAV, Virus de la Anemia Infecciosa Equina; RSV, Virus del Sarcoma de Rous; IAP, partícula intracisternal tipo A de ratón; FeLV, Virus de la Leucosis Felina. (Tomado de Field 5th edition a través de Compilation by D. Griffiths, University College, London).

## 1.2.2 Características estructurales

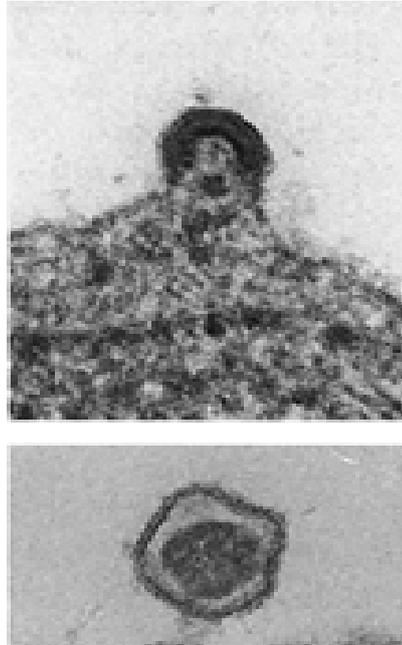
La partícula viral de VLB presenta entre 80 y 120 nm de diámetro, es un virión envuelto (presenta una envoltura lipídica) y de forma esférica (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de una partícula de VLB. Del interior al exterior, dos copias de ARN genómico junto con proteína de la nucleocápside, asociado a la proteasa, transcriptasa reversa e integrasa; cápside, matriz, envoltura lipídica con glicoproteínas transmembrana y glicoproteínas de superficie. (Adaptado de Science, 1988, 240 1427-1434).

El empaquetamiento del material genético con las proteínas virales para formar la partícula viral es un proceso complejo, que involucra primeramente la unión de regiones específicas del ARN genómico con la proteína mayoritaria de cápside, la proteína p24. Este complejo ribo-proteico primario, se ensambla junto con las enzimas virales transcriptasa reversa, proteasa e integrasa, y un número menor de copias de las proteínas p12 y p10. Asimismo, es posteriormente rodeado de una matriz amorfa constituida por la proteína p15, dando lugar a la nucleocápside completa en el citoplasma de la célula hospedera (Coffin, 1994). La partícula viral termina de formarse durante su extrusión de la célula, cuando el virión adquiere la envoltura mediante el proceso de exocitosis. Las proteínas virales de la envoltura gp51 (mayor de superficie)

y gp30 (de anclaje), son sintetizadas y translocadas a la superficie celular donde se incorporan al virión. Las mismas son ancladas, en primera instancia, en la bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática perteneciente a la célula hospedera (Figura 3) (Varmus, 1988).



**Figura 3.** Micrografía electrónica de partículas virales de VLB (imagen superior, partícula viral naciente; inferior, partícula extracelular madura)(Adaptado de Fields 5th edition).

### 1.2.3 Organización genómica

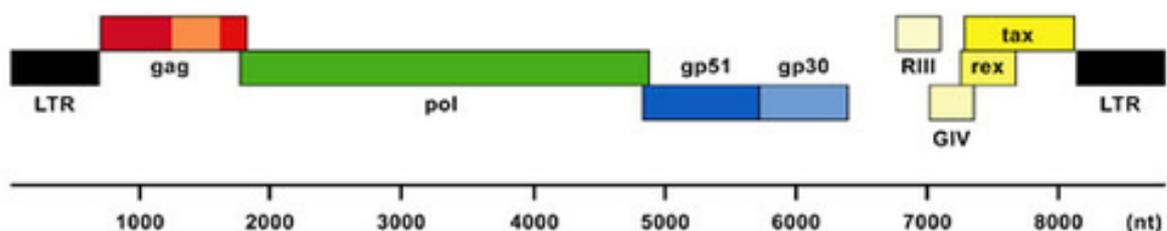
EL VLB presenta un genoma compuesto de dos copias idénticas de ácido ribonucleico (ARN), simple hebra y de polaridad positiva, unidas no covalentemente por el extremo 5', dando lugar a la formación de un dímero. El mismo consta de 8700 nucleótidos aproximadamente (Sagata et al., 1985b).

Al igual que el genoma de todos los retrovirus consta de regiones internas, con tres genes estructurales denominados *gag* (*group-associated antigen*), *pol* (*polymerase*) y *env* (*envelope*), en dirección 5' a 3', respectivamente. La expresión del gen *gag* codifica para una poliproteína precursora de 66 kDa (Pr 66) que se cliva posteriormente dando

lugar a las cuatro proteínas estructurales no glicosiladas: p24 o proteína mayoritaria del *core* viral, p15 o matriz, p12 y p10. El gen *prot* codifica en forma independiente para la proteasa viral (p14), responsable del clivaje de las poliproteínas precursoras. Las enzimas virales polimerasa, integrasa y endonucleasa, son sintetizadas a partir de un precursor de 145 kDa (Pr 145) originado en los genes *gag* y *pol*. El gen *env* codifica para un precursor de 72 kDa (Pr 72) del cual provienen las dos glicoproteínas de envoltura: gp51 o proteína mayor de superficie y gp30 o proteína transmembrana (Kettmann et al., 1994) (Figura 2)

El genoma se encuentra flanqueado por dos regiones no codificantes, que contienen secuencias comprometidas en los procesos de regulación de la expresión génica viral, denominadas *Long Terminal Repeats* o *LTRs* (Luciw y Leung, 1994) (Figura 4). Las regiones *LTR* son idénticas entre sí y están organizadas en 3 zonas denominadas U3-R-U5, 5' a 3', respectivamente. Se encuentran ubicadas a ambos extremos del genoma proviral y contienen secuencias regulatorias de importancia en la interacción virus-hospedero y durante los procesos de iniciación de la transcripción y maduración post-transcripcional (Xiao y Buehring, 1998; Kiermer et al., 1998).

Por otra parte, el genoma de VLB, presenta una región llamada X o pX, entre el gen *env* y el *LTR* del extremo 3' (Sagata et al., 1985a, 1985b), que contiene al menos 4 genes con marcos de lectura superpuestos, y que codifican para *tax*, *rex*, *RIII* y *GIV*, involucradas en asociación con secuencias presentes en los *LTRs*, en la regulación de la expresión viral a nivel transcripcional y post-transcripcional (Alexandersen et al., 1993; Kerkhofs et al., 1998).



**Figura 4:** Esquema de la organización genómica de VLB.

### 1.2.4 Transcripción y eventos post-transcripcionales

La iniciación de la síntesis de ARN tiene como actor principal a una secuencia promotora ubicada en la región *LTR* 5', así mismo es necesaria la supresión del promotor ubicado en la región *LTR* 3' (Luciw y Leung, 1994). El eficiente funcionamiento de las secuencias responsables de la transcripción presentes en el extremo 5' del *LTR* del genoma viral depende del producto de expresión del gen *tax*. El gen *tax* codifica para una fosfoproteína nuclear (p34Tax) que activa, en trans, la transcripción viral a partir del promotor único (TATA box) presente en U3 (Unk et al., 1994; Willems et al., 1987); y que requiere del "elemento de respuesta a Tax" o TxRe, también en la región U3 del *LTR* (Derse, 1987).

Durante la replicación y expresión de proteínas del VLB intervienen tres ARN mensajeros (ARNm), los cuales son generados mediante el mecanismo de splicing post-transcripcional. De esta forma a partir de un transcrito primario de 8.5kb se expresan las proteínas de los genes *gag* y *pol*, y también se produce la progenie viral (ARN genómico) (Haas et al., 1992) (Figura 5).

El transcrito primario sufre fenómenos de splicing simple y doble; y madura en dos ARNm subgenómicos, de 4.2 kb y 2.1kb, que son utilizados para la expresión del gen *env* y de los genes reguladores *tax* y *rex*, respectivamente (Alexandersen et al., 1993).

Se han identificado in vitro, otros 6 ARNm subgenómicos alternativos. Se ha comprobado la expresión a partir de dos marcos de lectura, llamados *RIII* y *GIV*, que codifican para proteínas de regulación cuyo rol no ha sido aún bien establecido (Alexandersen et al., 1993; Rovnak y Casey, 1999) (Figura 5).

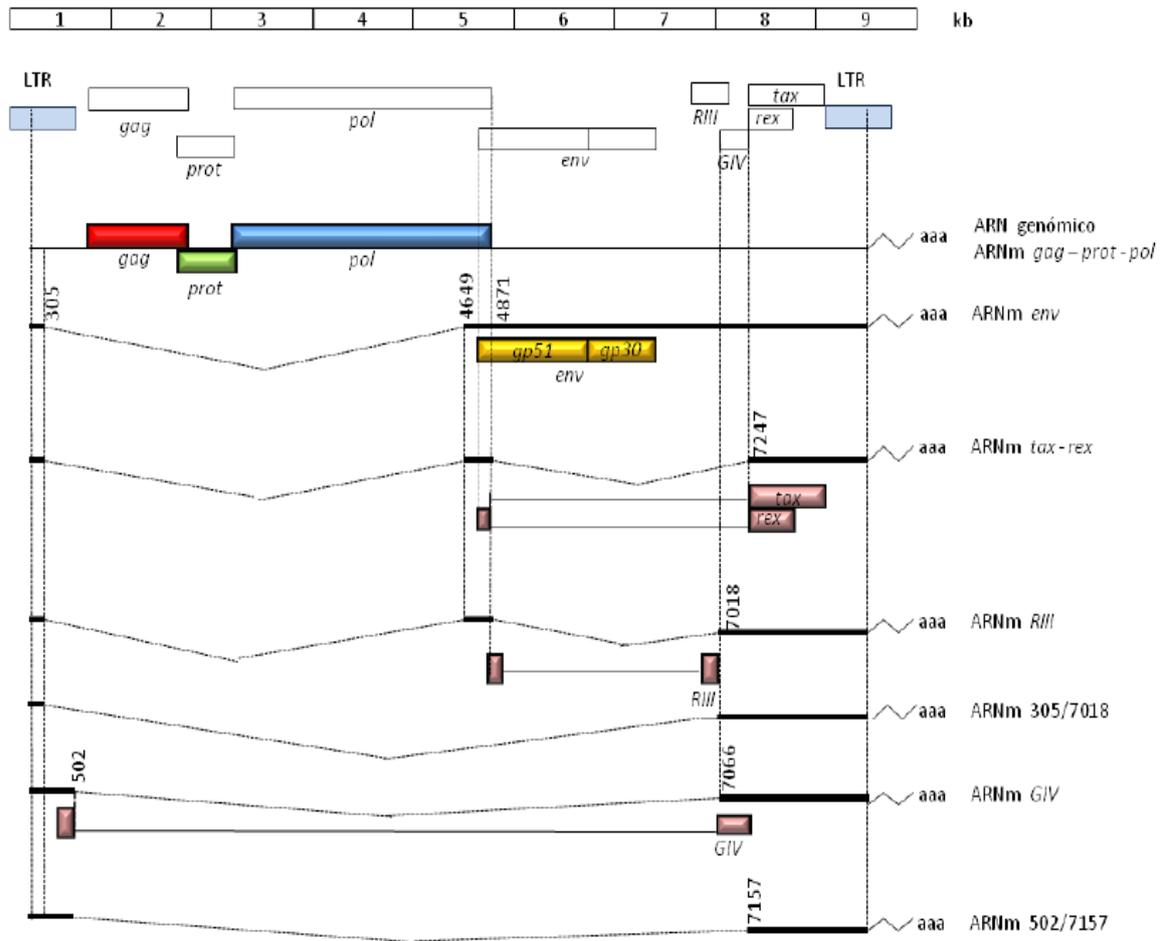
Mediante la utilización de la técnica de RT-PCR fueron evidenciados diferentes patrones de transcripción en los diferentes estadios patogénicos de la infección con VLB (Jensen et al., 1990). En el estado aleucémico, se puede evidenciar a bajos niveles pero de forma constante la presencia de ARN genómico y ARNm de la envoltura. Por

otra parte se ha podido evidenciar la presencia de ARNm de *tax* y *de rex* en el citoplasma de linfocitos de animales en todos los estadios (Haas et al., 1992).

El producto de expresión del gen *rex*, p18Rex, actúa a nivel post-transcripcional, como regulador de la expresión de los diferentes ARN transcriptos, aumentando la transcripción de los genes estructurales (Derse, 1988; Rovnak y Casey, 1999). Como resultado de la regulación positiva sobre los genes estructurales, Rex inhibe indirectamente la expresión de los genes de regulación *tax* y *rex*. La función de Rex es Tax independiente y requiere de una secuencia presente en las regiones U3-R de la *LTR* 3', a la cual se une directamente (Xiao y Buehring, 1998).

Finalmente, se ha demostrado que la proteína RIII inhibe la función de Rex *in vitro*, induciendo a la sobreproducción de proteínas de regulación y la falta de expresión del genoma viral completo (Willems et al., 1994), y se ha asociado a la linfocitosis persistente con una elevada expresión del gen *GIV* (Alexandersen et al., 1993).

La presencia continua de anticuerpos en los animales infectados indica la existencia de estimulación antigénica constante, lo que sugiere que VLB no persiste en un verdadero estado de latencia, sino que mantiene una frecuencia excepcionalmente baja de expresión, que se encontraría fuertemente regulada (Willems et al., 1995).



**Figura 5.** Representación esquemática del genoma proviral de VLB, con los marcos de lectura y mapa transcripcional. El genoma proviral completo, incluyendo los dos LTRs es de 8714 pares de bases, según la secuencia de Genbank K02120, reportada por Sagata et al. (1985b). Los sitios de splicing para los diferentes transcritos se indican según la posición inicial. (Adaptado de *J. Virology*, 1993 67:1, 39-52).

### 1.2.5 La glicoproteína gp 51

El gen *env* de VLB, tal como se mencionó anteriormente, codifica para un precursor peptídico denominado gp 72, el cual es clivado por acción de la proteasa viral dando lugar a las glicoproteínas gp30 y gp 51, transmembrana y de superficie respectivamente. Ambas proteínas se encuentran asociadas mediante puentes disulfuros.

Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales se demostró la presencia de ocho epitopes en gp51. La actividad biológica del virus (infectividad, inducción de sincicios y lisis celular por anticuerpo o complemento) está relacionada con estos epitopes presentes en la glicoproteína gp51 (Mamoun et al., 1990). Dicha proteína presenta un peso de 51 KDa y es utilizada para estudios filogenéticos como también para la detección de anticuerpos contra la misma en el diagnóstico de esta enfermedad. Asimismo, la glicoproteína gp51 es biológicamente muy importante ya que es responsable de la infectividad del virus. Su hipotética unión a un receptor celular específico es el paso inicial de la infección. La formación de sincicios *in vitro* es resultado de la unión de gp51 a la membrana de algunas células (Altaner et al., 1993). Dicha proteína, es hasta el momento el mayor candidato a presentar el dominio de unión a receptor celular y actor principal involucrado en etapas tempranas de infección viral (Johnston et al., 2000, 2002; Lavanya et al., 2008). El estudio de esta proteína es de fundamental interés para intentar dilucidar cual o cuales receptores celulares están involucrados en los pasos de reconocimiento e infección viral. Es importante resaltar que el receptor celular aún no ha sido encontrado, aunque, recientemente se ha propuesto como candidato la sub-unidad  $\delta$  del complejo AP3, el cual está involucrado en transporte intracelular, por lo que existe gran controversia, ya que es difícil entender su funcionamiento a nivel de receptor en la superficie celular (Lavanya et al., 2008).

### 1.2.6 Ciclo Replicativo

El VLB infecta células de la serie mononuclear, preferentemente linfocitos B CD5+ maduros, aunque se ha detectado en menor grado, la presencia de ARN mensajero viral en granulocitos, monocitos y linfocitos T CD8+ (Schwartz et al., 1994). Como otros retrovirus, este virus presenta una estrategia replicativa, que involucra dos etapas, una temprana, dependiente de proteínas virales y una tardía, dependiente de enzimas del hospedero y de los productos de los genes virales.

El primer paso del ciclo replicativo es el reconocimiento específico de los receptores de la célula hospedera por parte de las proteínas de la envoltura. Esta interacción genera un cambio conformacional en la proteína de la envoltura viral que da lugar a la penetración a través del mecanismo de fusión de membranas independiente de pH (Brasseur et al., 1988). Una vez en el citoplasma celular, ocurre la etapa de desnudamiento, seguida de la síntesis de ADN a partir del ARN viral mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa. Durante la etapa de retrotranscripción las secuencias presentes a ambos extremos del genoma viral se repiten en cada extremo del nuevo ADN dando lugar a los extremos terminales, como se mencionó anteriormente, denominados *LTRs*. La nueva molécula de ADN penetra en el núcleo celular y mediante la actividad de la enzima integrasa, se integra al azar al genoma del hospedero. La forma viral integrada es denominada provirus (Luciw y Leung, 1994). A pesar de poseer un genoma diploide, solo una de las moléculas de ADN generadas por retrotranscripción es integrada al genoma del hospedero. La integración del ADN lineal es un paso crítico que asegura la asociación estable con el genoma del hospedero. La integración viral marca el fin de la etapa temprana y el comienzo de la etapa tardía del ciclo de viral, donde se lleva a cabo la síntesis de ARN viral, síntesis de proteínas virales y ensamblaje de la progenie.

Inmediatamente después de la infección, se activa la expresión génica y la traducción de las proteínas necesarias para la producción de viriones maduros en la célula hospedera. Se puede identificar una viremia que dura de 10 a 12 días post-infección (Schwartz et al., 1994), después de la cual se genera una respuesta inmune

persistente, aunque ya no se pueden detectar viriones en los órganos de los animales infectados. La partícula viral se puede aislar de un individuo infectado únicamente cuando se realiza el cultivo *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) (Miller et al., 1985; Mammerickx et al., 1987).

Aunque *in vivo* la expresión genética viral parece estar inhibida, se puede detectar la presencia de ARN viral en uno de cada 2.000 a 50.000 linfocitos de bovinos clínicamente normales utilizando la técnica de hibridación *in situ* (Haas et al., 1992; Willems et al., 1993). Este proceso de inactivación de la expresión génica viral se debe a la compleja interacción entre factores de regulación viral y celular.

Se ha demostrado en cultivos a corto plazo de animales infectados de PBMCs, que el agregado de plasma, tanto bovino como humano, o de fluido linfático bovino bloquea la expresión de VLB (Gupta y Ferrer, 1982; Gupta et al., 1984; Zandomeni et al., 1992, 1994). Asimismo, recientemente se ha demostrado que un complejo que contiene fibronectina es capaz de inhibir la síntesis de p24 en cultivos de corto plazo de células mononucleares de sangre periférica (van den Heuvel y col., 2005).

Luego de la infección, la respuesta humoral, citotóxica y los factores plasmáticos podrían suprimir eficientemente el ciclo de replicación viral. Sin embargo, la presencia continua de anticuerpos en los animales infectados indica la existencia de estimulación antigénica constante, lo que sugiere que VLB no persiste en un verdadero estado de latencia, sino que mantiene una frecuencia excepcionalmente baja de expresión, que se encontraría fuertemente regulada (Willems et al., 1995). Recientemente, Florins y colaboradores (2007), propusieron que la represión de la expresión viral sería efectiva solo en una proporción de las células infectadas, mientras que la respuesta inmune eliminaría aquellas células con una transcripción viral activa, permitiendo solo una expansión mitótica de las células que portan el provirus. El resultado final de esta presión de selección del sistema inmune sería que solo aquellas células en las que el virus se encuentra silenciado transcripcionalmente sobrevivirían y se acumularían, llevando a la linfocitosis, mientras que aquellas que expresan genes virales serían

eliminadas y mantendrían estimulado al sistema inmune del animal durante toda su vida.

### **1.3 Variabilidad Genética de VLB**

Los virus de ARN explotan todos los mecanismos conocidos para generar variabilidad genética, los más frecuentes son la mutación y la recombinación. La mutación es un mecanismo clave en la generación de variación genética en los virus cuyo genoma está constituido por ARN, y el mismo se debe mayoritariamente a la carencia de actividad de corrección de errores de las ARN polimerasas, lo que determina una frecuencia de error del orden de  $10^{-4}$  sustituciones por nucleótido y ciclo replicativo. Ésta, es responsable de la generación de gran número de variantes virales en el curso de una infección (Bartenschlager y Lohmann 2000). Algunas de estas mutaciones acumuladas por ciclo de replicación son silenciosas o sinónimas, por lo cual no tienen impacto directo en la secuencia de aminoácidos de la proteína viral, pero sí pueden afectar la estructura secundaria del ARN. Otras mutaciones, las llamadas no sinónimas, llevan a cambios en la secuencia proteica y producen la emergencia de nuevas variantes. Adicionalmente existen mutaciones que llevan a la producción de virus defectuosos, las cuales son denominadas letales (Le Guillou-Guillemette et al. 2007). Muchas variantes sobreviven generando una suma de variantes diferentes en un mismo hospedero infectado, a este conjunto de variantes genéticas estrechamente relacionadas se le denomina cuasiespecies virales (Eigen y Schuster 1979; Eigen et al., 1981). Esta población es una nube dinámica de mutantes los cuales pueden cooperar o competir, la misma se considera como una unidad de selección (Domingo y cols. 2006; Vignuzzi et al., 2006; Domingo y Gomez 2007).

La presencia de diferentes poblaciones virales en un mismo hospedero, sean variantes que conforman al espectro de cuasiespecies o cepas de diferentes genotipos que co-infecten a una misma célula, abre la posibilidad de otro mecanismo de generación de diversidad genética denominado recombinación. Ésta consiste en la generación de nuevas estirpes a través de diferentes combinaciones genéticas entre variantes

distintas (Worobey y Holmes, 1999). Estos eventos pueden dar lugar a variantes difíciles de diferenciar de las cepas que recombinen en el caso de que éstas sean genéticamente similares. Sin embargo, cuando la recombinación ocurre entre variantes de distintos genotipos que circulan simultáneamente en la misma célula, pueden originar cepas con mayor capacidad de replicación, de más fácil transmisión o más virulentas (Salminen, 1995). Por esta razón, la recombinación es una herramienta muy efectiva para aumentar la variabilidad genética de una población viral, que provee a estos virus una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones impuestas por el sistema inmunitario del hospedero, así como a drogas o terapias antivirales (Nagy y Simón, 1997).

Sin embargo, a pesar de que VLB es un virus ARN, el mismo presenta una baja variabilidad genética debida principalmente a su latencia en el genoma del hospedero, y el uso de la mitosis celular como principal vía de replicación de su genoma.

En lo que respecta al estudio de la variabilidad genética del VLB, los primeros estudios han mostrado muy poca variación entre las diferentes estirpes analizadas (Coulston et al., 1990). La baja heterogeneidad genética de VLB se fundamenta en su relativa lenta tasa de sustitución nucleotídica (Willems et al., 1993). Sin embargo, estudios sobre la variabilidad genética y modo de evolución de VLB basados en análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción y secuenciación de ADN proviral de cepas de diferentes regiones geográficas, utilizando regiones parciales de genes estructurales, revelaron que VLB presenta un modo de evolución y una epidemiología molecular más compleja de la anteriormente prevista.

Estos estudios permitieron la clasificación de VLB en tres diferentes grupos genéticos denominado Bélgica, Australia y Japón (Mamoun et al., 1990; Molteni et al., 1996; Beier et al., 2001). Estudios más recientes, utilizando secuencias del gen *env* (444 pb), sugieren la presencia de un cuarto grupo genético compuesto por cepas aisladas en Chile y la diversificación del mismo en esta región geográfica (Felmer et al., 2005). También hay estudios evolutivos de VLB de cepas aisladas en Brasil y Argentina (Camargos et al., 2007; Monti et al., 2005). Por otro lado, el análisis llevado a cabo por Zhao y Buehring (2007) se realizó utilizando la secuencia completa del gen *env*. Este trabajo reveló la presencia de cuatro grupos genéticos: Consenso, EE.UU., Europa y

Costa Rica.

Los análisis evolutivos han avanzado considerablemente en los últimos años. La cada vez más numerosa base de datos y la complejidad de los modelos evolutivos de sustitución permiten hoy en día el desarrollo de mejores métodos para la construcción de árboles filogenéticos. Por lo tanto, el análisis de la variabilidad genética de VLB en diferentes zonas geográficas pueden ser de gran interés para la medicina veterinaria, ya que involucra aspectos relacionados con la patogenicidad, diagnóstico y eventualmente, en el desarrollo de estrategias de vacunación y manejo animal. Estudios de la diversificación viral pueden ser también muy importantes para dilucidar la posibilidad de transmisión viral a otras especies (Buehring et al., 2003).

## **1.4 Epidemiología**

La infección con el VLB está relacionada directamente con sistemas de manejo intensivo, con el estrecho contacto físico de los animales y con la importante participación del ser humano (Ferrer et al., 1981). Existe una clara tendencia a que la tasa de infección se incremente a medida de que aumenta la edad, siendo en general escasa la incidencia de la infección en individuos menores de 2 años (Dimmock et al., 1991). Se ha demostrado también una mayor susceptibilidad en animales con alto potencial lechero (Detilleux et al., 1991; Jacobs et al., 1991, 1995).

La transmisión natural en rodeos lecheros se produce en forma más lenta en aquellos en que existe una baja o moderada prevalencia de la infección, mientras que ésta difunde mucho más rápidamente en establecimientos con alta prevalencia (Dimmock et al., 1991). La edad en que los animales se contagian está influenciada por la situación epidemiológica dentro del rodeo, ya que en aquellos con elevadas prevalencias se favorece la aparición de la infección en individuos más jóvenes (DiGiacomo, 1992).

El VLB en condiciones naturales se presenta íntimamente asociado a los linfocitos, siendo muy raro que se pueda encontrar en forma de partículas libres (Johnson et al., 1992). Dado que la única fuente de virus son los linfocitos de los animales infectados, todos los materiales que puedan contener éste tipo de célula blanca representan el mayor factor de riesgo para la transmisión del virus. Prácticas de manejo que facilitan la transmisión horizontal del VLB incluyen tanto el contacto entre categorías, cómo procedimientos y materiales que posibiliten el pasaje de pequeñas cantidades de sangre entre un animal y otro (DiGiacomo, 1992; Pelzer, 1997). Dentro de ellos se destacan la castración, descorne, tatuajes u otras formas de identificación -caravanas, extracción de pezones supernumerarios, inyecciones, premunición, palpación rectal, etc. (Pelzer et al., 1993; Sargeant et al., 1997). Alguna de estas posibles formas de transmisión iatrogénica ha sido objeto de divergencias, como es el caso de la palpación rectal (Hopkins et al., 1991, 1997; Lassauzet et al., 1989; Shirley et al., 1997). El posible rol de artrópodos e insectos hematófagos también ha sido comprobado en forma experimental, aunque resulta difícil estimar su alcance en condiciones prácticas (DiGiacomo, 1992; Johnson et al., 1992; Perino et al., 1990; Wentink et al., 1993).

Estudios epidemiológicos estiman que en USA más del 10% del ganado lechero y cárnico están infectados con VLB, en tanto que en Argentina la infección representa a más del 30% del ganado bovino (Ferrer, 1980; Brenner et al, 1989; Trono et al, 2001; Monti et al, 2005).

## 1.5 Situación en la región y en nuestro país

En América del Sur, se han reportado niveles de prevalencia predial que rondan entre un 35 y 45% en Colombia, Venezuela y Chile (Alfonso et al., 1998; Marín et al., 1978; Islas et al., 1990), mientras que en Brasil alcanzó niveles de hasta un 70,4% (Abreu et al., 1990; Melo, 1992, Del Fava y Pituco, 2004). En el año 2001, Trono y colaboradores, realizaron el primer estudio a nivel de todo el territorio Argentino, analizando rodeos de tambos de las principales regiones lecheras de ese país y encontraron una prevalencia general de establecimientos del 84%, mientras que la prevalencia individual resultó ser del 32,85 % de los animales.

En un estudio realizado en Uruguay sobre 53 establecimientos lecheros del Departamento de Florida, donde se recolectaron en forma aleatoria muestras de sangre de 1060 animales, el análisis serológico permitió proyectar una prevalencia para la LBE en dicho Departamento de 46,62% (SD 4,23%) (Guarino, 2001, Revista del Plan Agropecuario N°96, marzo 2001). Según este trabajo, la prevalencia de LBE aumentó en comparación con muestreos previos lo cual podría relacionarse con la inexistencia de programas de control de la enfermedad y la tendencia de la infección a difundirse más rápidamente. En este estudio también se concluyó que el 61% de los productores estiman que la leucosis puede ser una limitante para la producción, por lo que sería conveniente que las autoridades estudien la posibilidad de implementar algún tipo de programa de control. Asimismo, en el año 2003 la seroprevalencia por ELISA en 60 establecimientos de los departamentos de San José, Florida y Colonia fue de 77%, 72% y 57%, respectivamente (Zaffaroni et al., 2007).

## 1.6 Problemática de VLB

En la LBE las pérdidas económicas directas por linfosarcoma son las más fácilmente visibles y cuantificables. Ellas implican una disminución en la producción, deterioro del estado general, y muerte o refugio de los animales afectados (Brenner et al., 1989; Rhodes et al., 2003; Shirley et al., 1997). Si bien en la mayoría de los establecimientos los casos de la neoplasia son poco frecuentes, en algunos rodeos la inusual incidencia de linfosarcoma determina un importante impacto económico (Brunner et al., 1997).

Respecto al efecto de la infección sobre la producción y reproducción de los rodeos infectados existen opiniones dispares y contradictorias. Existen estudios que no evidencian diferencias productivas entre animales seronegativos y seropositivos (Huber et al., 1981; Jacobs et al., 1991; Pollari et al., 1992; Rhodes et al., 2003). Otras investigaciones, sin embargo, han encontrado que los animales infectados presentan una disminución significativa en la producción lechera (Brenner et al., 1989; Da et al., 1993; Ott et al., 2003; Scott et al., 1990; Wu et al., 1989), alteraciones en la composición de la leche (Brunner et al., 1997; Da et al., 1993; Scott et al., 1990; Wu et al., 1989), incremento en el intervalo interparto (Brenner et al., 1989; Jacobs et al., 1995) y mayor índice de refugos (Brenner et al., 1989).

Por otra parte, las restricciones del mercado internacional y el alto costo de los programas de control representan un costo indirecto sumamente importante en la mayoría de los países. En un relevamiento efectuado por Ott et al. (2003), que comprendió 20 estados de USA, se concluyó que las vacas seropositivas tuvieron una disminución de 218 Kg. en su producción frente a las seronegativas. En el mencionado estudio las pérdidas económicas totales para USA se estimaron en 525 millones de U\$D (Ott et al., 2003).

Numerosos estudios han demostrado que el VLB se encuentra presente en leche de las vacas con LBE, y que a partir de ella es posible infectar experimentalmente bovinos u ovinos (Johnson et al., 1992; Rhodes et al., 2003). Tal circunstancia ha generado preocupación debido al riesgo que puede significar para el ser humano el consumo de tan vital alimento procedente de rodeos infectados. Importantes relevamientos se han efectuado y no ha sido posible determinar hasta el presente una relación entre el VLB

y de neoplasias linfoides en el ser humano (Wentink et al., 1993). No obstante ello, recientes estudios realizados por Buehring et al. (2003) han puesto en evidencia genoma del VLB y aún proteínas de la capsida en pacientes humanos con cáncer de mama (Buehring et al., 2003). El significado de los mismos todavía no está claro y es un terreno abierto a nuevas investigaciones.

## **2. Hipótesis de trabajo**

## **Hipótesis de investigación planteadas a lo largo de este trabajo de tesis.**

- EL Virus de la Leucosis Bovina presenta una epidemiología molecular más compleja de la detallada anteriormente.
- Mediante la secuenciación del genoma completo de estirpes de VLB aisladas de linfosarcoma se podrán identificar mutaciones características y diferentes a las estirpes de VLB que no desencadenan dicha presentación clínica
- Es posible corregir el error de los actuales métodos de secuenciación al analizar cuasiespecies virales mediante el diseño de librerías circulares que permitan leer al menos 3 veces la misma secuencia obtenida.

## 3. Objetivos

### **3.1 Objetivo general**

Contribuir al conocimiento sobre la biología de la Leucosis Bovina, mediante el estudio genómico, evolutivo y estructural de agente etiológico: VLB.

### **3.2 Objetivos específicos**

**3.2.1.** Estudiar el grado de variabilidad genética de las estirpes de VLB que circulan en el Uruguay mediante diferentes abordajes filogenéticos sobre la secuencia completa codificante para la proteína gp 51.

**3.2.2.** Analizar la epidemiología molecular de VLB en la región Sudamericana

**3.2.3.** Estudiar y caracterizar genomas de VLB provenientes de la presentación tumoral de esta enfermedad, linfosarcoma.

**3.2.4.** Producir la proteína gp 51 en diferentes sistemas de expresión

**3.2.5.** Diseñar librerías moleculares para el análisis y abordaje del estudio de la evolución de virus cuyos genomas están constituido por ARN, y por lo tanto, poder determinar de forma precisa la frecuencia de mutaciones de una cuasiespecie viral.

## **4. Variabilidad genética de VLB en Uruguay y en la región**

## 4.1 Resumen

Estudios recientes han revelado que las cepas de VLB se clasifican en seis genotipos diferentes, aunque se discute la existencia de otro posible genotipo. Con el objetivo de profundizar en este aspecto, se procedió al estudio del grado de variabilidad genética de las cepas de VLB que circulan en América del Sur, realizándose análisis filogenéticos a partir de secuencias del gen *env* gp 51. Los resultados de estos estudios revelaron la presencia de siete genotipos de VLB en esta región geográfica, así como también, la utilidad de una región parcial del gen *env* gp 51 para la realización de inferencias filogenéticas. Asimismo, un número significativo de sustituciones aminoacídicas encontrados en las cepas analizadas mapean en el segundo dominio de neutralización de gp 51. El modelado 3D de esta proteína reveló que estas sustituciones están situadas en la superficie de la molécula. Esto puede proporcionar una ventaja selectiva en la evasión de la respuesta inmune de neutralización del hospedero.

## 4.2 Marco teórico de la investigación

Como en todos los miembros de la familia *Retroviridae*, las glicoproteínas de envoltura (*env*) de VLB desempeñan un papel crucial en la infección viral y en la formación de sincitios (Portetelle et al., 1989; Callebaut et al., 1993), ya que probablemente contienen el dominio de unión al receptor (RBD) que interactúa con el receptor de superficie celular requerido para la entrada del virus (Johnston et al., 2002). El gen *env* de VLB codifica para una poliproteína precursora (gp 72) que se cliva en un péptido señal y las glicoproteínas gp 51 de superficie (SU) y gp 30 transmembrana (TM) (Mamoun et al., 1990).

La ubicación de las glicoproteínas *env* en la superficie de las partículas virales determina que serán el blanco natural de los anticuerpos neutralizantes específicos. Una infección con VLB desata la típica respuesta inmunológica que implica una producción fuerte y permanente de anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína *env*. Sin embargo, se ha informado de varios casos en que el ganado fue infectado persistentemente con VLB sin mostrar una respuesta de anticuerpos detectable (Fechner et al., 1997). Los primeros estudios sobre la variabilidad genética del gen *env* de VLB han demostrado muy poca variación entre distintos aislados (Portetelle et al., 1989; Coulson et al., 1990). Esta diversidad genética podría ser baja debido a la relativa baja tasa de sustitución del virus (Willems et al., 1993). Sin embargo, estudios basados en el análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), permitieron la clasificación de las cepas de VLB en un máximo de cinco genotipos diferentes (Fechner et al., 1997; Licursi et al., 2002; Asfaw et al., 2005). El análisis de secuencias del gen *env* gp 51 de VLB de diferentes regiones geográficas reveló la presencia de diferentes grupos genéticos que se correlacionaron con el origen geográfico de los aislamientos (Mamoun et al., 1990; Molteni et al., 1996; Beier et al., 2001; Camargos et al., 2002; Felmer et al., 2005; Monti et al., 2005; Zhao et al., 2007; Camargos et al., 2007). En base a análisis de secuencias completas de este gen, se ha propuesto recientemente una nueva clasificación de las cepas de VLB en seis genotipos, proponiendo la posible existencia de un séptimo (Rodríguez et al., 2009).

Existen pocos estudios sobre la variabilidad genética y heterogeneidad de VLB en la región Sudamericana. En un estudio realizado en Chile, donde se utilizaron secuencias parciales del gen *env*, se indicó la presencia de un grupo genético específico compuesto por cepas aisladas en dicho país (Felmer et al., 2005). Estudios evolutivos realizados en Brasil sugirieron que las cepas que allí circulan pertenecen al menos a dos clados filogenéticos diferentes (Camargos et al., 2007). Estudios similares efectuados en Argentina revelaron la presencia de dos tipos de cepas de VLB en productos lácteos de rebaños, designados como *Australia* y *Argentina* (Monti et al., 2005). Sin embargo, estudios muy recientes revelaron la presencia de al menos cuatro genotipos distintos circulando en aquel país (Rodríguez et al., 2009).

Recientemente se han obtenido nuevas secuencias del gen *env* gp 51 de VLB a partir de estirpes aisladas en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Con el objetivo de profundizar en el grado de variabilidad genética de VLB en la región Sudamericana, se realizaron análisis filogenéticos. Los resultados de estos estudios revelaron la presencia de siete genotipos de VLB en esta región del mundo, así como la utilidad de secuencias parciales del gen *env* gp 51 para la inferencia filogenética.

### 4.3 Objetivo

El objetivo de este capítulo es contribuir al conocimiento de la biología del Virus de la Leucosis Bovina, mediante el estudio de la epidemiología molecular de VLB en la región Sudamericana utilizando diferentes abordajes filogenéticos.

Para alcanzar este objetivo nos basamos en los siguientes puntos de trabajo, los cuales son detallados a continuación:

1- Puesta a punto y optimización de diferentes metodologías para la extracción de ADN proviral de células mononucleares de sangre periférica y células somáticas de la leche.

2- Estudiar el grado de variabilidad genética de las estirpes de VLB que circulan en el Uruguay mediante diferentes abordajes filogenéticos sobre la secuencia completa codificante para la proteína gp 51, y compararlo con las estirpes circulantes en la región.

## **4.4 Materiales y Métodos**

### **4.4.1 Toma y procesamiento de muestras**

Se utilizaron muestras que fueron obtenidas durante muestreos veterinarios de rutina, realizados en establecimientos lecheros de todo el país donde la enfermedad se presentaba de forma endémica. Se analizaron previamente un total de 456 animales por la técnica de IDGA y ELISA con el fin de obtener alrededor de 200 animales seropositivos para VLB. Las muestras se extrajeron por venopunción coccígea en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) sin y con anticoagulante. De ese total, se realizó hemograma para determinar la presencia de linfocitosis persistente (de muchas de las muestras ya contamos con esta información la cual fue realizada por veterinarios).

A partir de las muestras de sangre periférica obtenidas se realizó la extracción de células mononucleares (PBMC). Asimismo, se obtuvieron células somáticas a partir de muestras de leche. De esta forma, mediante la recolección de las muestras anteriormente mencionadas, comenzó la construcción del banco de muestras de VLB.

### **4.4.2 Detección de anticuerpos anti-VLB**

Para los análisis de los sueros por IDGA y ELISA las muestras fueron centrifugadas antes de las 48 hrs durante 10 min a 2000 rpm y luego se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. Para la extracción de ADN las muestras de sangre fueron procesadas en las primeras 24 hrs desde su obtención.

### **4.4.3 IDGA**

Los sueros se procesaron utilizando la técnica de referencia de IDGA (Beier., 2008). La misma se llevó a cabo mediante la utilización de un kit comercial, cedido por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata Argentina (aprobado

por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agrolimentaria, SENASA, Argentina, Exp. 41.285/87). Las muestras se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante (FCV-UNLP-Argentina). Se utilizó una solución de agar al 1% en buffer Tris-HCl con 8.5% de NaCl pH 8 y se sembraron 35 µl de cada una de las muestras. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente con humedad hasta su lectura final (72 hrs). Fue incluido en este ensayo un control positivo incluido en el kit.

#### **4.4.4 ELISA**

Para el análisis de ELISA se utilizó un kit comercial para anticuerpos contra VLB para suero bovino con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Laboratorio VMRD, cod. 5505.20, WA, USA), aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Las muestras fueron procesadas de acuerdo a las indicaciones del fabricante, utilizando 50 µl de suero diluido a 1/25. La lectura fue realizada en un espectrofotómetro de rango visible a 620 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizaron tres controles positivos débiles por placa, que poseen una baja concentración de anticuerpos contra el virus estableciéndose la línea de corte para cada placa a partir del promedio de sus densidades ópticas (DO).

#### **4.4.5 Extracción de ADN**

El ADN genómico fue extraído a partir de PBMC y células somáticas de la leche de vacas lecheras infectadas con VLB mediante el uso del kit *QIAmp DNA Blood Mini Kit* de QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante

#### **4.4.6 Amplificación por PCR del gen *env gp 51***

La amplificación por PCR del gen completo *env gp 51* (903 pb) se realizó utilizando los siguientes oligos: directo, 5'- ATG GAA AAA CCY CGA CGG -3', y reverso, 5'- CGA CGG CAG TAG GTC TGA CCC- 3'. La mezcla de reacción final contenía Tris HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 200 µM, cada oligonucleótido a 200 nM, y 1 U de

Taq polimerasa (Invitrogen, EE.UU). Las condiciones para la amplificación por PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 4 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 60 seg, *annealing* a 55 °C durante 60 seg, y extensión a 72 °C durante 60 seg; seguido por una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los fragmentos parciales del gen *env gp 51* de VLB (413 y 311 pb) fueron amplificados de acuerdo con la PCR anidada desarrollada por Ballagi-Pordány *et al.* (Ballagi-Pordány *et al.*, 1992).

En todos los ensayos como control positivo se utilizó ADN de células FLK (Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectadas con VLB (Miller y Van der Maaten, 1975). Como control sistémico de la presencia de ADN genómico en las muestras a diagnosticar se amplificó un fragmento de 400 pb del gen GAPDH para cada muestra (Tiscornia *et al.*, 2004). Como control negativo se utilizó agua destilada filtrada en lugar de ADN genómico. Se cuantificaron las concentraciones de ADN midiendo su absorbancia en el equipo NanoDrop.

#### **4.4.7 Electroforesis en gel de agarosa**

Con el fin de observar los productos obtenidos en la amplificación, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X. Para la obtención del gel se preparó una solución de agarosa en buffer TAE 1X (40mM Tris- Acetato, 10mM EDTA pH 8) y se calentó hasta que se tornara transparente. Se mezcló con bromuro de etidio (BrEt), un agente intercalante mutagénico que bajo luz UV intensifica su emisión, permitiendo visualizar las bandas. Se dejó enfriar unos minutos y la preparación se vertió dentro de las cubetas niveladas de forma correcta. Se dejó gelificar por aproximadamente 20 minutos para poder retirar los peines y verter sobre el gel 100 ml de TAE 1X, como buffer de corrida.

A continuación se sembraron los 50 µl de cada producto de PCR con 10 µl de buffer de carga 6X compuesto de Azul de bromofenol y Xilencianol, repartiendo el contenido de cada producto en dos pocillos del gel. Se sembró también como referente de corrida dos marcadores de peso molecular de 100 pb y de 1 kb de (Invitrogen). La corrida fue

realizada durante 30 min a 90 voltios (V). Por último el gel se visualizó en un documentador de geles con luz ultravioleta (Gel Doc X5 170-8170, Biorad).

#### **4.4.8 Purificación del producto de PCR**

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados a partir del gel de agarosa, utilizando el kit de purificación de QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante.

De modo de confirmar que la purificación fue correcta se corrieron 5  $\mu$ l de cada purificado de ADN en un gel de agarosa al 1,5%, y finalmente se cuantificó su concentración midiendo la absorbancia en nanodrop.

#### **4.4.9 Clonación de productos amplificados**

##### **4.4.9.1 Ligación al vector de clonado *p-Gem T-Easy***

La ligación al vector de clonado *pGem-T-Easy* (Promega) se realizó en una solución de volumen final de 10  $\mu$ L que contenía: 3  $\mu$ l del producto de la purificación, 1  $\mu$ l de *pGem-T-Easy* (50 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de ADN ligasa T4 (Promega) (3 U/ $\mu$ l) en 6  $\mu$ l del buffer de reacción [30 mM Tris-HCl pH 7.8, 5% PEG, 20 mM DTT y 20 mM MgCl<sub>2</sub>]. La concentración molar de inserto en la mezcla de reacción se estimó en 2 nM mientras que la del plásmido *pGem-T Easy* fue de 2,5 nM. La mezcla se incubó toda la noche a 4 °C.

##### **4.4.9.2 Transformación de *E. coli***

La transformación de la cepa *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-Blue con *pGem-T-Easy* recombinante se realizó utilizando el método de shock térmico (Licursi et al., 2002). Para la transformación las células quimiocompetentes (*E. coli*) fueron retiradas del freezer a -80 °C y colocadas directamente en hielo por 5 min. A cada tubo conteniendo aproximadamente 50  $\mu$ l de células se les incorporó 0,5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol y 3  $\mu$ l

de producto de ligación. Se dejaron los tubos 30 min en hielo, y luego se realizó el shock térmico por 45 seg a 42 °C. Enseguida a cada reacción de transformación se le incorporaron 800 µl de medio LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl) a temperatura ambiente y se incubaron las células a 37 °C por una hora con agitación a 220 rpm.

#### 4.4.9.3 Plaqueo

Las colonias XL1 transformantes se sembraron, en condiciones asépticas, en placas de LB-agar [10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, 15 g/l agar] que contenían ampicilina (100 µg/ml). Previo a ello, se esparcieron 40 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-Dgalactopiranosido) 20 ng/µl y 7 µl de IPTG (isopropil β-tiogalactopiranosido) 1M sobre las placas.

Se sembraron, en primero lugar, 150 µl de las células transformantes en cada placa. Las células restantes en los tubos se concentraron aún más en su medio de cultivo centrifugando a máxima velocidad por 30 segundos, descartando parte del sobrenadante. El pellet celular fue resuspendido en 150 µl de LB y posteriormente plaqueados en las placas LB-ampicilina. Una vez culminado el proceso se dejaron las placas en estufa a 37 °C durante toda la noche.

#### 4.4.9.4 Reconocimiento por α-complementación

El vector de clonado pGem-T- Easy, de 3015 pares de bases, incluye un pequeño fragmento del gen de la β galactosidasa (gen *lacZ*) de *E. coli* que contiene secuencias reguladoras y codifica para los primeros 146 aminoácidos de la porción amino terminal de la enzima (fragmento α). Dentro de esta región se encuentra un sitio de clonado múltiple que mantiene el marco de lectura del fragmento α. Este vector se utiliza junto con células hospederas que expresan la porción carboxilo terminal de la β galactosidasa (fragmento ω). Ni el fragmento α que porta el plásmido ni el fragmento

$\omega$ , codificado en el genoma de la bacteria, son activos por separado sino que se asocian para dar lugar a la enzima activa. Este tipo de mecanismo, donde mutantes con deleciones en el segmento proximal del operador del gen *lacZ* son complementados por mutantes negativos para la  $\beta$  galactosidasa que poseen el segmento proximal del operador intacto, es llamado  $\alpha$ -complementación.

Las bacterias transformadas no recombinantes lac + resultantes son fácilmente reconocibles porque forman colonias azules en presencia del cromógeno X-Gal. Este último es sustrato de  $\beta$  galactosidasa y genera un producto azul al ser hidrolizado por la enzima. Habitualmente, la inserción de un fragmento en el sitio de clonado del plásmido impide esta  $\alpha$ -complementación al producir un fragmento  $\alpha$  inactivo. De esta forma, las bacterias transformadas con plásmidos recombinantes forman colonias blancas en presencia de X-gal y así son reconocidas.

La expresión del fragmento  $\omega$  se encuentra regulada por el represor lac el cual puede ser desplazado por una molécula de IPTG. De este modo la presencia de IPTG es necesaria para que se de la  $\alpha$ -complementación.

En condiciones de esterilidad, las colonias blancas seleccionadas fueron crecidas en tubos conteniendo 4ml de medio LB-Ampicilina durante toda la noche a 37 °C con agitación a 220 rpm.

#### **4.4.9.5 Extracción del ADN plasmídico por Lisis Alcalina**

La extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas se realizó por Lisis Alcalina. Para ello el cultivo crecido durante toda la noche se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos y se aspiró su sobrenadante. El pellet se resuspendió primero en una solución fría P1 [50 mM Glucosa 25 mM Tris-Cl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)]. A cada tubo se le agregó 200  $\mu$ l de solución fresca P2 [0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS] y se dejó reposar en hielo por 5 min. Luego se incorporaron 150  $\mu$ l de una solución fría P3 [60ml Acetato de Potasio (5M), 11,5 ml Ácido acético glacial, 28,5 ml H<sub>2</sub>O], se dejó nuevamente 5 min en hielo, y se centrifugaron los tubos a 4 °C a máxima

velocidad por 8 min. Se conservó el sobrenadante que presenta el ADN plasmídico y se le incorporaron 800 µl de EtOH al 100%. Se centrifugó a 4 °C a máxima velocidad por 5 min donde el ADN se precipitó en el pellet. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de EtOH 70%. Luego de 5 min en hielo se centrifugó a 4 °C a máxima velocidad por 2 min. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar bien el pellet en el tubo. Cada tubo conteniendo el pellet de ADN plasmídico fue resuspendido en una solución conteniendo 35 µl de agua pura Milli-Q y 1 µl de la enzima ARNasa (10 mg/ml). Por último se dejó incubando a 65 °C por 10 min, temperatura óptima donde es activa la ARNasa.

#### **4.4.9.6 Confirmación de clones positivos**

Se visualizaron los insertos luego de una digestión con enzimas de restricción. Para ello se seleccionaron las minipreps cuyos vectores contienen el inserto a modo de poder discriminar las bandas al momento de correr la digestión en un gel de agarosa. La digestión se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo: 4 µl del ADN producto de la Miniprep, 0,5 µl de enzima de restricción EcoR1 (10 U/µl), 2 µl de su solución buffer 10X correspondiente y H<sub>2</sub>O pura Milli-Q suficiente para completar el volumen final. El mix de reacción se dejó a 37 °C durante toda la noche.

#### **4.4.10 Secuenciación**

La secuenciación de los productos de PCR fue realizada en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. Se secuenciaron ambas hebras de los plásmidos purificados utilizando los oligos universales T7 y SP6 mediante el kit *Big Dye DNA sequencing kit* (Perkin-Elmer) en un secuenciador *373 DNA Sequencer* (Perkin-Elmer).

#### 4.4.11 Análisis filogenéticos

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Una vez obtenido el alineamiento, se utilizó el programa Model Generator (Keane et al., 2006) para identificar el modelo evolutivo óptimo para describir al conjunto de secuencias. Mediante dos aproximaciones (*Akaike information criteria* y *hierarchical likelihood ratio test*), se indicó que el modelo de sustitución nucleotídico HKY +  $\Gamma$  es el que mejor se ajusta a nuestros datos de secuencia. Utilizando este modelo se procedió a la construcción de árboles filogenéticos de máxima verosimilitud mediante el programa PhyML (Guindon et al., 2005). Como medida de la robustez de cada nodo se utilizó el método aLRT (*approximate Likelihood Ratio Test*), que asume que la rama en estudio provee una verosimilitud significativa en contra de la hipótesis nula, que implica el colapso que esta rama del árbol filogenético dejando el resto de la topología idéntica (Anisimova y Gascuel., 2006). El aLRT se calculó utilizando tres enfoques diferentes: (a) cálculos de mínimos cuadrados, (b) un procedimiento del tipo Shimodaira-Hasegawa (SH-like) (Shimodaira y Hasegawa., 2001; Shimodaira., 2002) que es no paramétrico, y (c) una combinación de ambos (SH-like y cálculos de mínimos cuadrados), que es la opción más conservadora para estos cálculos. Además, se utilizó el método de *bootstrap*.

#### 4.4.12 Modelado estructural 3D de la proteína gp 51 de VLB

Un modelo 3D de homología estructural del RBD de gp 51 fue realizado utilizando el programa MODELLER version 9v6 (Picard et al., 1997). Se utilizó la estructura cristalográfica más cercana a modo de patrón (PDBID: 1 AOL\_A, identidad de 12,3%), correspondiente al RBD de la glicoproteína *env* del Virus de la Leucemia Murina de Friend (F-MLV-RBD) (Fass et al., 1997). La secuencia que contiene el presunto RBD de gp 51 de VLB (posiciones de aminoácidos 1-152) fue alineada con F-MLV-RBD utilizando Clustal W (Thompson et al., 1994) y luego corregida manualmente para eliminar posibles errores de alineamiento, comparando con alineamientos de secuencias de proteínas relacionadas que se encuentran en la base de datos Pfam

(Finn et al., 2006). El modelado se realizó mediante la ejecución de una rutina automatizada de modelado comparativo, y el mejor modelo generado fue elegido a partir de su menor energía de DOPE (Discrete Optimized Protein Energy). Para mejorar la precisión, una segunda ronda de optimización fue realizada utilizando las secuencias de comandos apropiadas del programa MODELLER mediante la inspección/corrección manual de elementos de estructura secundaria, basado en relaciones estructura-secuencia entre RBDs de F-MLV y VLB. Cinco modelos fueron obtenidos, y el de menor valor de DOPE fue seleccionado. La visualización, corrección manual y preparación de la figura fue realizada con el programa PyMOL (<http://www.pymol.org>).

#### **4.4.13 Números de acceso de secuencias nucleotídicas**

Las secuencias reportadas en este trabajo fueron subidas a la base de datos EMBL Database. Los nombres, números de acceso y la ubicación geográfica de todas las secuencias implicadas en este estudio, se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1. Tabla de secuencias.** En la tabla se puede observar el nombre de la secuencia, el numero de acceso y el pais de aislamiento de estirpes de VLB utilizadas en este trabajo.

Nombre	Pais de aislamiento	Numero de acceso	Nombre	Pais de aislamiento	Numero de acceso	Pais de aislamiento	Numero de acceso	Pais de aislamiento	Numero de acceso
Uru L01VI	Uruguay	FM955545	Uru L03I	Uruguay	FM955550	Argentina	AB099319	Brasil	DQ059419
Uru L01VII	Uruguay	FM955546	Uru L03III	Uruguay	FM955551	Argentina	AB099320	Brasil	DQ059420
Uru L01VIII	Uruguay	FM955547	Uru L07I	Uruguay	FM955569	Argentina	AB099321	Brasil	DQ059421
Uru L01IX	Uruguay	FM955548	Uru L07II	Uruguay	FM955570	Argentina	AB099322	Chile	AY515273
Uru L01X	Uruguay	FM955549	Uru L07III	Uruguay	FM955571	Argentina	AB099323	Chile	AY515274
Uru L09I	Uruguay	FM955577	Uru L07V	Uruguay	FM955572	Argentina	AB099324	Chile	AY515275
Uru L09II	Uruguay	FM955578	Uru L07VI	Uruguay	FM955573	Argentina	AB099325	Chile	AY515276
Uru L09VI	Uruguay	FM955581	Uru L07VII	Uruguay	FM955574	Argentina	AB099326	Chile	AY515277
Uru L09XI	Uruguay	FM955582	Uru L07VIII	Uruguay	FM955575	Argentina	AB099327	Chile	AY515278
Uru L09XXI	Uruguay	FM955583	Uru L07IX	Uruguay	FM955576	Argentina	AF257515	Chile	AY515279
Uru C05I	Uruguay	FM955552		Argentina	AB099305	Argentina	AF485773	Chile	AY515280
Uru C05II	Uruguay	FM955553		Argentina	AB099306	Argentina	AF547184	Costa Rica	EF065635
Uru C05III	Uruguay	FM955554		Argentina	AB099308	Argentina	FJ808588	Costa Rica	EF065636
Uru C05IV	Uruguay	FM955555		Argentina	AB099309	Argentina	FJ808589	Costa Rica	EF065637
Uru C05V	Uruguay	FM955556		Argentina	AB099312	Argentina	FJ808590	Costa Rica	EF065639
Uru C06I	Uruguay	FM955557		Argentina	AB099313	Argentina	FJ808591	Costa Rica	EF065640
Uru C06II	Uruguay	FM955558		Argentina	AB099314	Argentina	FJ808592	Costa Rica	EF065643
Uru C06III	Uruguay	FM955559		Argentina	AB099316	Argentina	FJ808593	Costa Rica	EF065645
Uru C06IV	Uruguay	FM955560		Argentina	AB099317	Argentina	FJ808594	Costa Rica	EF065654
Uru C06VI	Uruguay	FM955561		Argentina	AB099318	Argentina	FJ808595	Costa Rica	EF065655

**Tabla 1. Tabla de secuencias.** En la tabla se puede observar el nombre de la secuencia, el numero de acceso y el pais de aislamiento de estirpes de VLB utilizadas en este trabajo.

Nombre	Pais de aislamiento	Numero de acceso						
Uru 7	Uruguay	FM209474	Argentina	AF257515	Argentina	FJ808596	Francia	M35238
Uru 13	Uruguay	FM209475	Argentina	AF485773	Argentina	FJ808597	Francia	M35239
Uru 18	Uruguay	FM209473	Argentina	AF547184	Argentina	FJ808598	Italia	S83530
Uru 24	Uruguay	FM209472	Argentina	FJ808571	Austria	D00647	Japon	EF065646
Uru 33	Uruguay	FM209470	Argentina	FJ808572	Bélgica	AF503581	Japon	EF065650
Uru 34	Uruguay	FM209469	Argentina	FJ808573	Bélgica	EF065638	Japon	EF065651
Uru 38	Uruguay	FM209471	Argentina	FJ808574	Bélgica	M35240	Japon	EF065652
Uru MC	Uruguay	FM209468	Argentina	FJ808575	Bélgica	M35238	Japon	EF065653
Uru 1JD	Uruguay	FM955567	Argentina	FJ808576	Bélgica	K02251	Japon	EF065657
Uru 1r1	Uruguay	FM955563	Argentina	FJ808577	Brasil	AF399702	Japon	EF065658
Uru1R2	Uruguay	FM955564	Argentina	FJ808578	Brasil	AF399703	Japon	EF065659
Uru8JD	Uruguay	FM955565	Argentina	FJ808579	Brasil	AF399704	Japon	EF065660
Uru9JD	Uruguay	FM955566	Argentina	FJ808580	Brasil	AY185360	Japon	EF065661
Uru11JD	Uruguay	FM955568	Argentina	FJ808581	Brasil	AY277947	Japon	EF065662
Uru1100	Uruguay	FM955562	Argentina	FJ808582	Brasil	AY283061	Japon	K02120
Uru L01I	Uruguay	FM955540	Argentina	FJ808583	Brasil	AY283060	USA	M35239
Uru L01II	Uruguay	FM955541	Argentina	FJ808584	Brasil	DQ059415	USA	M35242
Uru L01III	Uruguay	FM955542	Argentina	FJ808585	Brasil	DQ059416	USA	EF065641
Uru L01IV	Uruguay	FM955543	Argentina	FJ808586	Brasil	DQ059417	USA	EF065642
Uru L01V	Uruguay	FM955544	Argentina	FJ808587	Brasil	DQ059418	USA	EF065644
	USA	EF065647	USA	EF065648	USA	EF065649	USA	EF065656

## 4.5 Resultados

### 4.5.1 Ensayo de ELISA

Los resultados del ensayo de ELISA para los sueros bovinos pueden observarse en la tabla 2. De un total de 425 sueros analizados se detectó un 71,5% de muestras positivas para VLB. Por otro lado 111 de los sueros, que corresponde a un 26,1% fueron negativos, y solamente 10 muestras (2,4%) se catalogaron como “borde”, una categoría indeterminada por su D.O.

Tabla 2. Resultados de los ensayos de ELISA.

edad	Positivos (%)	Borde (%)	Negativos (%)	Total (%)
<6 meses	14 (25,9%)	3 ( 5,6%)	37 (68,5%)	54 (100%)
<1 año	22 (40,7%)	0 ( 0,0%)	32 (59,3%)	54 (100%)
1-2 años	38 (53,6%)	3 ( 4,2%)	30 (42,2%)	71 (100%)
Vacas	229 (93,9%)	4 ( 1,6%)	11 ( 4,5%)	244 (100%)
Toros	1 (50,0%)	0 ( 0,0%)	1 (50,0%)	2 (100%)
<b>Total</b>	<b>304 (71,5%)</b>	<b>10 ( 2,4%)</b>	<b>111 (26,1%)</b>	<b>425 (100%)</b>

### 4.5.2 Amplificación por PCR del gen *env gp 51*

Luego de realizar el ensayo de serología, fueron seleccionadas las muestras de sangre entera positivas, para la extracción de ADN de las PBMC y posterior amplificación y clonación del fragmento *env gp 51*. Los mismos fueron clonados de forma exitosa y la selección de los clones positivos se realizó a través de la digestión con enzima EcoR1. Los resultados de la digestión se observan en la figura 6.

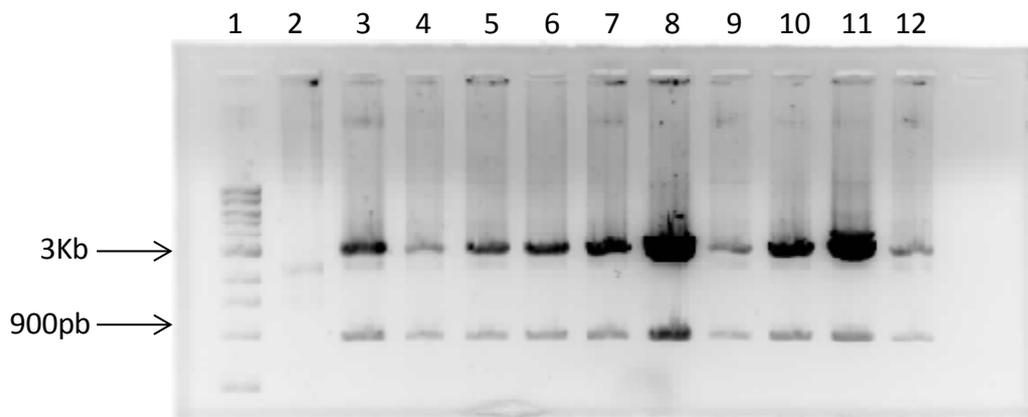


Figura 6. Gel de agarosa para la visualización del inserto *env gp 51* por digestión con enzimas de restricción. Se puede apreciar en el carril 1 el marcador de peso molecular de 1Kb; en el carril 2 un control negativo y en los carriles 3 al 12 se observan las bandas correspondientes al vector a 3 Kb y al inserto a 900pb.

#### 4.5.3 Análisis filogenéticos de cepas de VLB

Con el objetivo de estudiar el grado de variabilidad genética de las estirpes de VLB aisladas en la región Sudamericana, se obtuvieron secuencias completas del gen *env gp 51* de 8 cepas de VLB aisladas en Uruguay. Estas secuencias fueron alineadas con 31 secuencias correspondientes de cepas aisladas en Argentina y Brasil, así como 37 secuencias de cepas aisladas en otras regiones geográficas, representando todos los genotipos de VLB.

Una vez obtenido el alineamiento, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud utilizando el modelo de sustitución nucleotídica HKY +  $\Gamma$ . Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 7.

Todas las cepas en el árbol se agrupan en 7 clados, que representan los siete genotipos descritos recientemente (Rodríguez et al., 2009). Todos los clados están apoyados por altos valores de aLRT (ver Figura 7). Las estirpes aisladas en Uruguay se agrupan con variantes del genotipo 1 (ver Figura 7, centro). Las cepas aisladas en Argentina se asignaron a los genotipos 1, 2, 4 y 6, siendo el genotipo 2 exclusivamente representado por cepas de este país (ver Figura 7, abajo). Las cepas aisladas en Brasil fueron asignadas a los genotipos 1 y 6, siendo el primero representado exclusivamente por cepas aisladas en Argentina y Brasil (ver Figura 7, parte inferior). Los resultados de

estos estudios sugieren la diversificación de las cepas de VLB en cuatro genotipos diferentes.

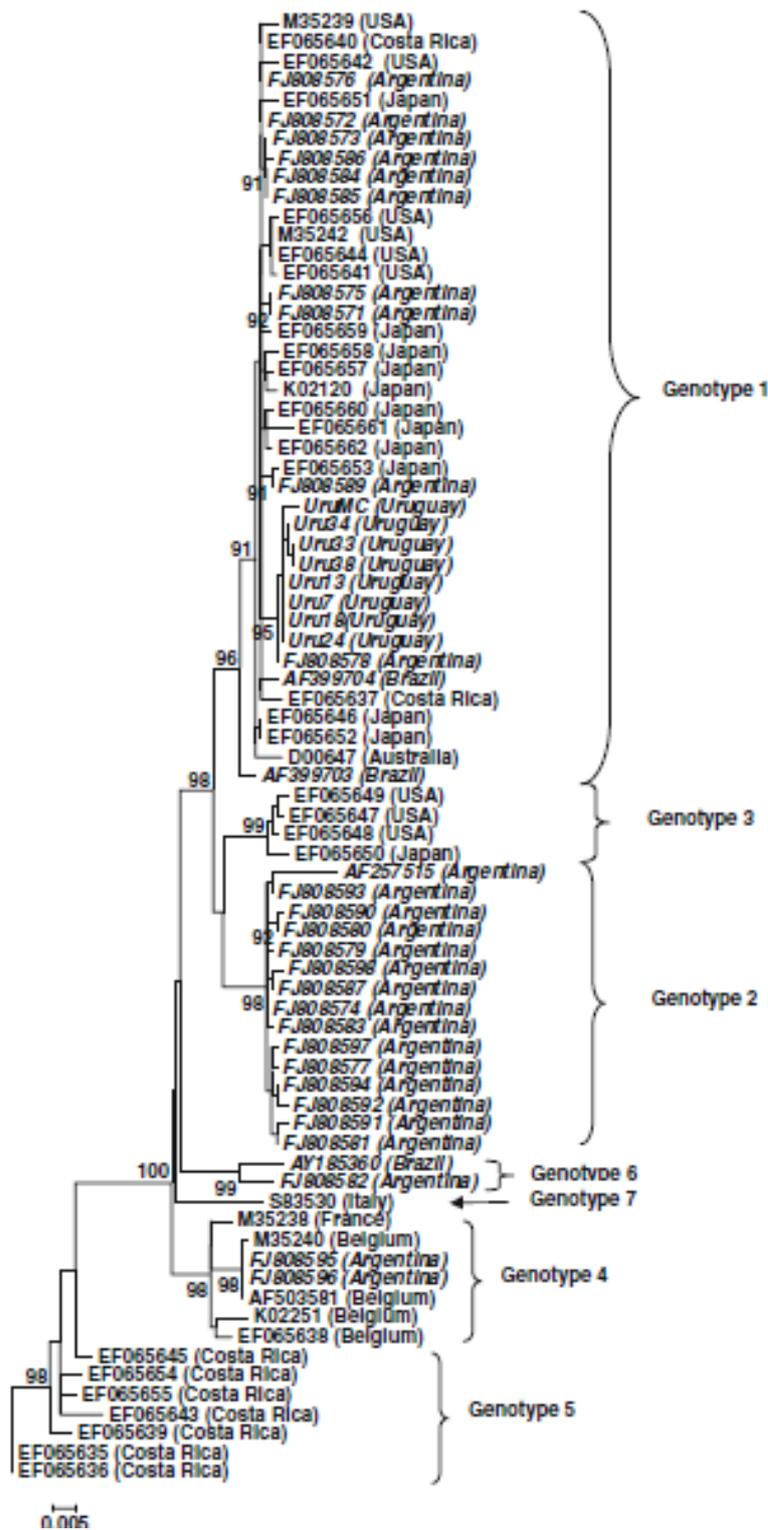


Figura 7. Árbol de máxima verosimilitud de cepas de VLB utilizando secuencias completas del gen *env gp 51*. Las cepas se indican mediante sus números de acceso, con el país de aislamiento entre paréntesis. Los genotipos se indican a la derecha de la figura, de acuerdo a Rodríguez *et al.* (Rodríguez *et al.*, 2009). Las cepas de VLB aisladas en América del Sur se muestran en cursiva. Los números en las ramas indican los valores de aLRT estimados mediante el cálculo del tipo SH, de acuerdo a Anisimova y Gascuel (Anisimova y Gascuel., 2006), tal como se aplica en el programa PhyML (Guindon *et al.*, 2005). La barra en la parte inferior de la figura denota distancia.

Recientemente, una cantidad significativa de secuencias parciales del gen *env* gp 51, han sido obtenidas a partir de cepas aisladas en Argentina, Brasil y Chile (Felmer et al., 2005; Monti et al., 2005; Camargos et al., 2007). En este trabajo, se obtuvieron 42 secuencias parciales del gen *env* gp 51 a partir de muestras aisladas en Uruguay. Con el objetivo de conocer el grado de variabilidad genética de VLB en la región, así como para establecer la utilidad de secuencias parciales del gen *env* gp 51 para el establecimiento de relaciones filogenéticas, se repitieron los mismos estudios utilizando 123 secuencias de cepas aisladas en América del Sur (para 33 de ellas, su genotipo se había establecido con anterioridad utilizando secuencias completas del gen *env* gp 51) y 24 secuencias de cepas de VLB aisladas en otras regiones, representando todos los genotipos de VLB ( para las que también se ha establecido su genotipo con anterioridad) (Rodríguez et al., 2009). Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 8.

Se puede apreciar nuevamente que todas las cepas incluidas en estos estudios fueron asignados a siete linajes genéticos, correspondientes a los siete genotipos de VLB establecidos recientemente (Rodríguez et al., 2009). Todos estos grupos fueron apoyados por altos valores de aLRT (ver Figura 8). Todas las cepas de VLB aisladas en Uruguay fueron asignados al genotipo 1, de acuerdo con los resultados anteriores utilizando secuencias completas del gen *env* gp 51 (comparar Figuras 7 y 8).

Una situación diferente se puede apreciar en el caso de Argentina, donde al menos tres genotipos diferentes co-circulan (1, 2 y 4). Todos los cepas del genotipo 2 incluidas en estos estudios proceden de aislamientos realizados en Argentina (ver Fig. 3, centro). Esto también concuerda con los resultados encontrados utilizando secuencias completas del gen *env* gp 51 (comparar Figuras 7 y 8).

Curiosamente, la cepa S83530 aislada en Italia, que es la única cepa propuesta del genotipo 7 de VLB, comparte un clado con un alto apoyo estadístico con cepas de VLB aisladas en Chile y Brasil (ver Figura 8, abajo). Este hallazgo sugiere que este genotipo de hecho existe y está presente en la región de América del Sur. Al menos cuatro genotipos distintos (1, 5, 6 y 7) circulan en Brasil (ver Figura 8). Este resultado es

concordante con estudios previos de variabilidad genética de VLB realizados en Brasil (Camargos et al., 2002; Camargos et al., 2007).

Por otra parte, dos genotipos diferentes se encontraron en Chile (4 y 7). Las cepas chilenas del genotipo 4 comparten una estrecha relación genética entre ellas en relación con las demás variantes de este genotipo. Esto concuerda con el grupo genético específico para cepas aisladas en Chile que fue propuesto por Felmer y colaboradores (Felmer et al., 2005). Tomando todos estos resultados en su conjunto, podemos detectar la presencia de los siete genotipos VLB en la región de América del Sur.



#### **4.5.4 Sustituciones aminoacídicas en la proteína *env* gp 51 de cepas de VLB aisladas en Sudamérica**

Para observar los cambios de aminoácidos observados en las cepas de VLB aisladas en América del Sur, procedimos a alinear secuencias parciales del gen *env* gp 51 de estirpes aisladas en la región, usando el programa Clustal W (Thompson et al., 1994) y posteriormente se tradujeron las secuencias nucleotídicas a aminoácidos utilizando el programa MEGA 4 (Kumar et al., 2007). Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 9.

Se puede apreciar que las sustituciones de aminoácidos en la proteína gp 51 de las cepas de VLB aisladas en América del Sur no están dispersos a lo largo de toda la proteína, sino que en su mayoría se sitúan en el segundo dominio de neutralización de la proteína gp 51 (ver Figura 9). Una sustitución significativa puede observarse en algunas cepas aisladas en Uruguay y Brasil en la posición 134 de la proteína gp 51, donde se sustituyó el ácido aspártico (D) por una asparagina (N) (ver Figura 9). Estas cepas también comparten una sustitución de fenilalanina (F) por una serina (S) en la posición 146. Las cepas aisladas en la Argentina y algunas de las cepas aisladas en Brasil, comparten una sustitución de N a D en la posición 141 de gp 51 (ver Figura 9).

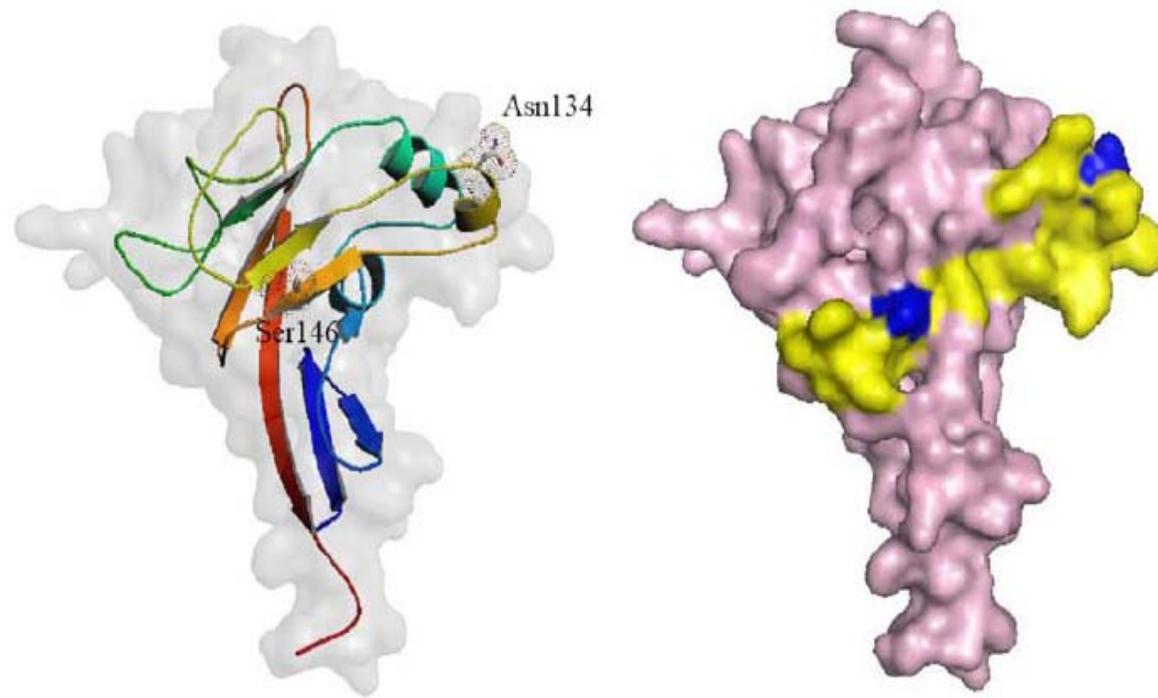
#### **4.5.5 Modelado 3D del RBD de *env* gp 51**

Los cambios de aminoácidos en la proteína gp 51 de las cepas de VLB aisladas en América del Sur, sumado al claro agrupamiento filogenético que deriva del análisis de una región clave en las propiedades fusogénicas del virus y en su reconocimiento por parte del sistema inmune (Callebaut et al., 1993), nos llevó a generar un modelo tridimensional de la proteína y así poder mapear y evaluar de una forma más detallada la posible implicancia de estas mutaciones. Hasta la fecha, la información estructural sobre una glicoproteína de la envoltura retroviral codificada sólo está disponible para el RBD N-terminal del virus F-MLV. El plegamiento general de RBD se caracteriza por un núcleo compuesto por una hoja- $\beta$  antiparalela, con alternancia de bucles intra-

hebra y regiones helicoidales (llamados VRA, VRB y VRC), que determinan el tropismo viral. Sin embargo, la falta de identidad de secuencia significativa entre las proteínas de VLB y el F-MLV ha dificultado la fiabilidad de los modelos del RBD de gp 51. Para generar un modelo 3D de VLB-gp 51, hemos seguido un enfoque de modelado estructural basado en la idea de que a pesar de una baja similaridad, ambas proteínas deben compartir un modelo de plegamiento polipeptídico en común. De esta forma se realizó el modelado de homología con el programa MODELLER, utilizando un alineamiento entre secuencias del RBD de F-MLV y otras secuencias RBD retrovirales existentes en las bases de datos (descrito en detalle en Materiales y métodos previamente). Nuestro modelo presenta el típico pliegue del RBD, con una hoja- $\beta$  antiparalela central y segmentos de hélice-bucle similar a las regiones variables VRA, VRB, y VRC (Figura 10). Una diferencia notable surge del hecho de que la longitud del RBD de VLB es más corta que la de F-MLV, lo que resulta en un segmento del tipo-VRA pequeño. Todas las sustituciones aminoacídicas encontradas en la proteína *env* gp 51 de VLB aislados en Sudamérica están expuestas en la superficie del segundo epítipo neutralizante, una ubicación que sugiere una posible implicancia en la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Esto implica que puede ocurrir un reconocimiento inmune diferencial entre cepas de VLB de diferentes localizaciones geográficas.

	<u>CD4+ Epitope</u>		<u>Zn binding peptide</u>			<u>E epitope</u>	
	<u>1st ND</u>	<u>G</u>	<u>2nd ND</u>	<u>CD8+ epitope</u>			
<b>K02120 (Japan)</b>	<b>GARAMVTYDCEPRCEYVVGADRFDCPHWDNASQADQGSEFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYPDPLITFSLHKIPDPPQPDPFQLNSDWVPSV</b>						
FM955570 (Uruguay)	-----						
FM955571 (Uruguay)	-----						
FM955572 (Uruguay)	-----						
FM955576 (Uruguay)	-----						
FM209468 (Uruguay)	-----						
FM209469 (Uruguay)	-----						
FM209471 (Uruguay)	-----						
FM209470 (Uruguay)	-----						
DQ059418 (Brazil)	-----						
DQ059422 (Brazil)	-----						
DQ059417 (Brazil)	-----						
DQ059421 (Brazil)	-----						
DQ059420 (Brazil)	-----						
AY185360 (Brazil)	-----						
DQ059416 (Brazil)	-----						
AF399702 (Brazil)	-----						
AF399704 (Brazil)	-----						
AP257515 (Argentina)	-----						
AB099324 (Argentina)	-----						
AB099323 (Argentina)	-----						
AB099322 (Argentina)	-----						
AB099320 (Argentina)	-----						
AB099317 (Argentina)	-----						
AY515274 (Chile)	-----						
AY515276 (Chile)	-----						
AY515280 (Chile)	-----						
AY515278 (Chile)	-----						
AY515277 (Chile)	-----						
AY515275 (Chile)	-----						

**Figura 9. Alineamiento de secuencias aminoacídicas correspondiente al gen *env gp 51* de cepas de VLB aisladas en América del Sur.** Las cepas se indican mediante el número de acceso en el lado izquierdo de la figura, seguido por el país de aislamiento. Las secuencias de aminoácidos se indican con el código de una letra. La identidad de la cepa de referencia K02120, aislado en Japón, se indica mediante un guión. Las posiciones de epítopes de células T CD4+ y CD8+, el primer y segundo dominio de neutralización (ND), epítipo lineal E, epítipo conformacional G, y un péptido de unión a Zn, de acuerdo con Zhao y Buehring (Zhao y Buehring., 2007), se indican en la parte superior de la secuencia del alineamiento. Los residuos subrayados corresponden a D-134, N-141 y F-146.



**Figura 10 Modelo 3D de la proteína *env* gp 51 de VLB.** A) Un modelo tridimensional de la RBD de VLB-gp 51 generado sobre la base de similitud de secuencias con la estructura de rayos X de F-MLV-RBD (ver Material y Métodos). Se indican las posiciones de las sustituciones de aminoácidos encontrados en cepas de VLB aisladas en Uruguay. B) Representación en volumen del presunto gp 51-RBD de VLB. Las mutaciones indicadas en A) se señalan en azul para resaltar su exposición al solvente. Ambos residuos están espacialmente contenidos en la superficie accesible del RBD, indicándose en amarillo el segundo dominio neutralizante.

## 4.6 Discusión

Se ha asumido que VLB exhibe una alta estabilidad genética. Este bajo grado de variabilidad genética puede explicarse por el hecho de que VLB replica su ADN proviral principalmente por medio de la replicación mitótica de las células B infectadas, con una menor participación por parte de la transcripción reversa viral.

Los primeros estudios sobre la composición de aminoácidos de *env* gp 51 de VLB mostraron regiones altamente conservadas en esta proteína de diferentes cepas (Portetelle et al., 1989; Coulson et al., 1990; Mamoun et al., 1990). Sin embargo, estudios más recientes revelaron que el grado de variabilidad genética de VLB es mayor que lo estimado anteriormente (Licursi et al., 2003; Felmer et al., 2005; Zhao y Buehring., 2007 Rodríguez et al., 2009). En base al análisis de regiones completas del gen *env* de VLB, se ha propuesto recientemente una nueva clasificación de este virus en 6 genotipos distintos, con la posibilidad de un séptimo (Rodríguez et al., 2009). Los resultados de nuestros estudios concuerdan con este reporte, revelando la presencia de siete grupos genéticos de VLB y confirmando por primera vez que circulan en la región Sudamericana (ver Figura 8).

La presencia de más de un genotipo de VLB en esta región geográfica puede ser explicada por las actuales tendencias comerciales de ganado (Camargos et al., 2007; Zhao y Buehring., 2007). El hecho de que el gen *env* gp 51 codifica para la proteína de superficie de la envoltura de VLB, que naturalmente está sometida a presiones del sistema inmune y procesos de selección (Portetelle et al., 1989), hacen que esta región contenga información clave para la realización de inferencias filogenéticas (Zhao y Buehring., 2007). En este trabajo realizamos análisis filogenéticos con la región completa y con regiones parciales del gen *env* gp 51, y éstas fueron comparables, lo que revela la utilidad de estas secuencias parciales para la determinación de relaciones filogenéticas entre distintas cepas de VLB (comparar las Figuras 7 y 8).

Diferentes situaciones epidemiológicas se han encontrado en diferentes países de América del Sur (Figura 7). Mientras todas las cepas de VLB aisladas en Uruguay

pertenecen al genotipo 1, por lo menos cuatro genotipos diferentes circulan en Brasil (1, 5, 6 y 7), tres en Argentina (1, 2 y 4) y dos en Chile (4 y 7). No hay cepas del genotipo 3 de VLB que hayan sido incluidas en estos estudios (ver Figuras 7 y 8). Todas las estirpes del genotipo 2 analizadas fueron aisladas en Argentina (ver Figuras 7 y 8), lo que revela el agrupamiento área geográfica específico de ciertas cepas de VLB. En el caso de Chile, algunas de las cepas allí aisladas se asignan al genotipo 4, mientras que otras comparten una estrecha relación genética con la cepa S83530, que había sido reportado como el único miembro del genotipo 7 (Rodríguez et al., 2009), (ver Figura 8, abajo). Esto apoya la posibilidad de que este genotipo exista y esté presente en la región de América del Sur.

Un importante número de las sustituciones aminoacídicas en la proteína gp 51 de cepas de VLB aisladas en América del Sur, mapean en el segundo dominio de neutralización de esta proteína, lo que concuerda con análisis evolutivos realizados recientemente (Zhao y Buehring., 2007; Rodriguez et al., 2009), (véase también la Figura 9). Se ha informado que este dominio podría estar involucrado en la interacción de gp 51 con el receptor expresado en la membrana de las células del hospedero, por lo que esta región está directamente implicada en la unión del virus, y por ende, en la infectividad de éste (Callebaut et al., 1993; Gatot et al., 2002). En particular, dos cambios aminoacídicos en las posiciones 134 (D-N) y 146 (F-S), son compartidos entre una cepa brasileña y la mayor parte de las cepas uruguayas (ver Figura 9). Para comprender en mayor medida la implicancia de la ubicación de estas mutaciones, hemos generado un modelo tridimensional del presunto RBD de gp 51 de VLB, en base a la información de la estructura cristalográfica del RBD de F-MLV (PDB: 1AOL) que se utilizó como patrón (Figura 10). Como se muestra en el modelo, las sustituciones de aminoácidos se encuentran en el segundo dominio de neutralización de la proteína *env* gp 51 de las cepas de VLB aisladas en la región Sudamericana, ubicándose sobre la superficie de la molécula. En particular, el cambio de aminoacídico en la posición 134 (D a N) cambia la carga neta de un bucle (véase la Figura 10). Varios inmunoensayos diseñados para la detección de anticuerpos anti-VLB utilizan como antígeno a gp 51. Sin embargo, se ha informado de que varios animales fueron positivos por PCR pero

negativos por análisis serológicos (Monti et al., 2005). En particular, Fechner y colaboradores, (Fechner et al., 1997) observaron que algunas variantes de VLB no eran detectadas por anticuerpos mediante métodos serológicos y propusieron que la variabilidad de secuencia de cepas de VLB puede dar lugar a diferencias antigénicas que podrían afectar a la identificación serológica viral en las poblaciones de bovinos infectados de diferentes áreas geográficas. Sin embargo, otros estudios informaron que no hay una correlación entre el genotipo de VLB y el estado serológico de los animales infectados, sugiriendo que la diferencia en la respuesta inmune antiviral puede estar relacionada con la etapa de la infección y otros factores del hospedero (Licursi et al., 2002).

Los resultados de estos estudios revelaron un mayor grado de variabilidad genética que el esperado, con siete genotipos de VLB diferentes circulando en la región de Sudamérica. Estos estudios serán de relevancia para la aplicación de políticas de manejo de ganado adecuadas y desarrollo de estrategias antivirales y de vacunación adecuadas para la región de América del Sur.

## **5. Caracterización molecular de genomas completos de VLB extraídos de Linfoma.**

## 5.1 Resumen

El VLB es un miembro oncogénico de la familia *Retroviridae*, y como se mencionó anteriormente es responsable de la generación de linfomas en hasta un 10 % de las vacas infectadas. Asimismo, es ampliamente aceptado que la mayoría de los cánceres resultan de múltiples eventos celulares que tornan hacia la malignidad luego de un prolongado período de latencia clínica, así como del rol crítico que juega el sistema inmune en el control de la progresión de esta enfermedad. Hasta el momento han sido reportadas solamente 5 secuencias genómicas completas de cepas de VLB, las cuales fueron aisladas de células mononucleares de sangre periférica de bovinos y de otros orígenes. Extrañamente, no se ha reportado aún genomas completos de este virus extraído directamente de linfomas de vacas que presentan la manifestación tumoral de esta enfermedad. Con el fin de contribuir a la comprensión de los mecanismos de leucemogénesis que induce VLB en el ganado, es necesario realizar una detallada caracterización de genomas completos de estirpes aisladas directamente de linfomas.

En este estudio, se realizó el análisis y caracterización molecular de genomas completos de cepas de VLB aisladas directamente de linfomas de vacas infectadas. Se encontró una sustitución nucleotídica en el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) localizado en la región 5'LTR. Por otro lado, sustituciones aminoacídicas en Tax, previamente reportadas y asociadas al incremento de la transcripción viral, no fueron encontradas en este trabajo. Sin embargo, otras sustituciones en esta proteína si fueron reportadas.

Consiguientemente, encontramos sustituciones de aminoácidos en las proteínas de nucleocápside, gp51 y G4. Asimismo, se observó también codones prematuros de terminación en R3. Estas mutaciones o sustituciones de aminoácidos encontradas, podrían estar favoreciendo la supresión de la expresión viral en las células B infectadas, como una estrategia para evadir una respuesta inmune efectiva.

## 5.2 Marco teórico de la investigación

El genoma de VLB, tal como se mencionó en el capítulo 1, está constituido por dos copias idénticas de ARN, simple hebra, de polaridad positiva, unidas no covalentemente por el extremo 5', dando lugar a la formación de un dímero. El mismo tiene un tamaño de aproximadamente 8700 nucleótidos (Sagata, 1985b). En el mismo, pueden destacarse importantes regiones involucradas en la regulación y morfogénesis viral, las cuales son de gran interés para estudiar su variabilidad genética y mutaciones diferenciales de relevancia, como por ejemplo las regiones *LTR*. Dichas regiones son idénticas entre sí y están organizadas en 3 zonas denominadas U3-R-U5, 5' a 3' respectivamente. Se encuentran ubicadas a ambos extremos del genoma proviral y contienen secuencias regulatorias de importancia en la interacción virus-hospedero y durante los procesos de iniciación de la transcripción y maduración post-transcripcional (Xiao, 1998; Kiermer, 1998).

Por otro lado la región X presenta especial importancia en cuanto a la regulación y activación de la transcripción viral (Zhao et al, 2007; Dube et al., 2009). La región X (también denominada pXBL) del genoma del VLB se localiza entre la región *env* y el LTR en posición 3' y es encargada de codificar la región 3' de las proteínas reguladoras del virus. Estas proteínas son cuatro: Tax, Rex, R3 y G4. Rex es una fosfoproteína nuclear de regulación post-transcripcional, que actúa estabilizando y permitiendo la exportación hacia el citoplasma de los ARNs genómicos y de los ARNs mensajeros que codifican para las proteínas estructurales. R3 estaría implicada, al igual que Rex, en la regulación post-transcripcional de la expresión viral. Por otro lado, G4 está localizada en el núcleo y la mitocondria; se cree que está implicada en la transformación celular. R3 y G4 no son indispensables para la infectividad in vivo pero la integridad de estos genes es esencial para la propagación eficiente de la infección dentro del hospedero (Gillet et al., 2007). Finalmente Tax es un activador transcripcional viral que aumenta la unión de factores de transcripción al ADN, promoviendo de esta forma, la síntesis de proteínas virales. Se localiza principalmente en el núcleo. La proteína Tax presenta también un potencial oncogénico, actuando en cooperación con la oncoproteína Ha-

ras en la transformación completa de fibroblastos embrionarios de rata primarios (Willems et al., 1990). Las funciones de transactivación y de inmortalización pueden ser dissociadas mediante la introducción de mutaciones inducidas in vitro en regiones específicas de la proteína (Willems et al., 1992).

Los principales elementos reguladores a nivel del genoma viral son tres copias de una secuencia potenciadora, no estrictamente conservada, de 21 pb ubicada en el 5' LTR, denominadas elementos de respuesta a Tax (TxRE). Los TxREs son esenciales para la respuesta del promotor a Tax (Derse, 1987). Es de destacar que Tax no se une directamente al TxRE sino que interactúa con proteínas celulares como ser los factores de transcripción CREB, ATF-1 y ATF-2 (Adam et al., 1996). Ha sido demostrada la existencia de variantes genéticas de Tax que determinan algunas diferencias en el comportamiento biológico del VLB (Dube et al., 2009), a su vez algunos mutantes de Tax provenientes de aislados naturales presentan variación en su capacidad de transactivación (Tajima y Aida., 2000).

Sin embargo, hasta el momento no se han vinculado variantes naturales del virus asociadas a las diferentes expresiones clínicas de la enfermedad. En este sentido la alta prevalencia de la LBE en nuestro país constituye una ventaja por la posibilidad de la presencia de este tipo de variantes virales.

Es sumamente importante destacar que en la actualidad solo existen 5 genomas completos disponibles en la base de datos, de los cuales 1 es proveniente de un cultivo celular persistentemente infectado (FLK), con el cual también contamos en el laboratorio y usamos como control positivo, otro es obtenido mediante la infección experimental de una oveja (Dube et al 2009) y es de origen argentino y solamente 3 son salvajes (algunas sin ser la secuencia completa en su totalidad). Estas son estirpes virales de Argentina, Japón y USA-Bélgica y ninguna es proveniente de un linfosarcoma. (Rice et al., 1985; Sagata et al., 1985; Dube et al., 2000). Por otro lado hay secuencias que no están completas pero han sido muy importantes para el avance en el estudio de la genómica de este virus como es una cepa Australiana (Coulston et al., 1990).

Es por esta razón que el estudio y caracterización molecular de diferentes genomas virales presentes en bovinos que padezcan la presentación tumoral de la enfermedad puede ser clave para entender la patogenia de la misma.

### 5.3 Objetivo

El objetivo de este capítulo es contribuir al conocimiento de la biología del Virus de la Leucosis Bovina y el proceso de leucemogénesis que el mismo provoca, mediante un análisis genómico basado en la caracterización molecular y estudio exhaustivo de estirpes virales presentes en bovinos infectados que presenten la manifestación clínica tumoral de esta enfermedad.

Para alcanzar este objetivo nos basamos en los siguientes puntos de trabajo, los cuales se detallan a continuación:

- 1- Puesta a punto y optimización de diferentes metodologías para la amplificación, clonación y secuenciación del genoma completo de VLB.
- 2- Caracterizar genomas virales presentes en bovinos infectados con la manifestación tumoral de la enfermedad, linfosarcoma, con especial énfasis en regiones genómicas claves como son el 5´LTR, *env* y *tax*.
- 3- Estudiar el grado de variabilidad genética de las estirpes de VLB que circulan en el Uruguay utilizando genomas completos, comparando nuestras estirpes con estirpes pertenecientes a diferentes regiones geográficas y comparando las mismas con genomas completos de otros miembros del género Deltaretrovirus.

## **5.4 Materiales y Métodos**

### **5.4.1 Procesamiento de Muestras**

El diagnóstico de animales con linfosarcoma fue realizado por veterinarios especializados, Una vez refugados se procedió a la necropsia correspondiente de modo de obtener las muestras de tumor solido. Las mismas pertenecieron a 2 vacas de establecimientos diferentes y fueron cedidas para la realización de este trabajo. A partir de éstas, se realizó la caracterización molecular de diferentes genomas virales.

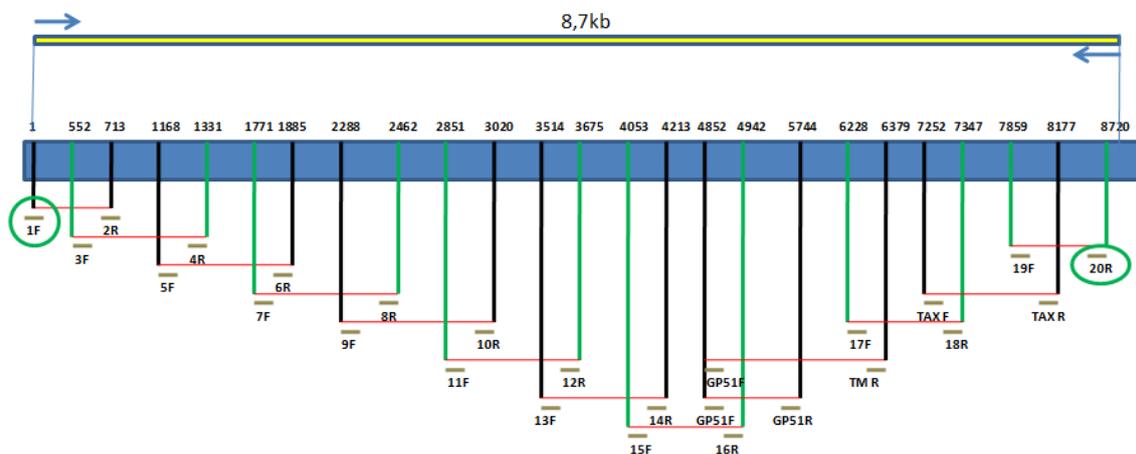
### **5.4.2 Extracción de ADN y PCR anidada**

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de las muestras de tumor solido mediante digestión con proteinasa K y precipitación con NaCl, según protocolo modificado de Miller, Dykes y Polesky (1988). Luego, se realizó un ensayo de PCR anidada confirmatoria para amplificar una región altamente conservada del gen *env* que codifica para la glicoproteína de superficie gp51 de la envoltura viral del VLB (ver punto 4.4.6).

En todos los ensayos como control positivo se utilizó ADN de células FLK (Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectadas con VLB (Van der Maaten y Miller, 1975). Como control sistémico de la presencia de ADN genómico en las muestras a diagnosticar se amplificó un fragmento de 400 pb del gen GAPDH para cada muestra (Tiscornia y col., 2004). Como control negativo se utilizó agua destilada filtrada en lugar de ADN genómico. Se cuantificaron las concentraciones de ADN midiendo su absorbancia en el NanoDrop.

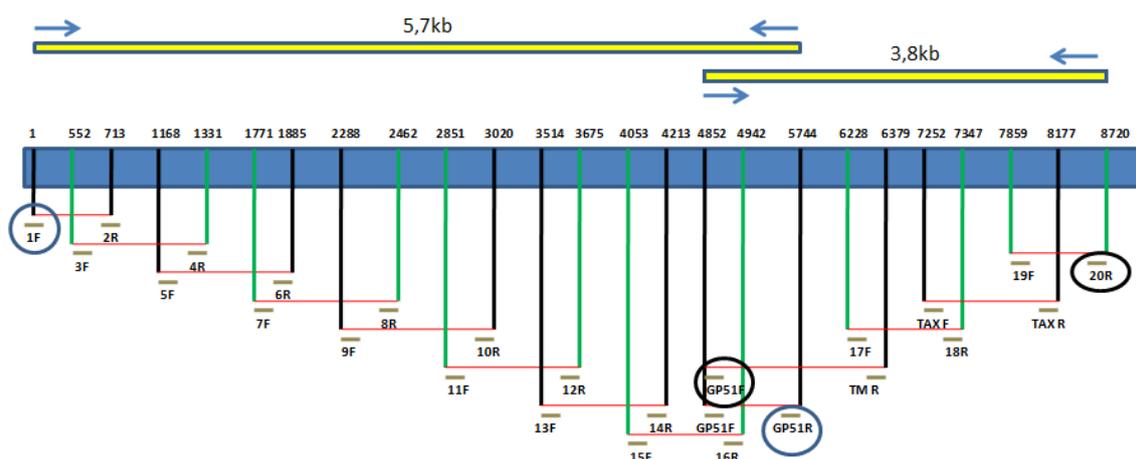
### 5.4.3 Amplificación del genoma completo de VLB

Para la realización de la amplificación del genoma completo de VLB se diseñaron tres estrategias diferentes y utilizó ADN de células FLK para la optimización y elaboración de un control positivo, así como también para su implementación a lo largo de toda la metodología. La primera estrategia se basó de un solo juego de oligos : 1F - 5' TGT ATG AAA GAT CAT GCC GAC 3' (sentido) y 20R- 5' CTC TCC TGG CCG CTA GAG GGC 3' (anti sentido) y se utilizó la enzima TAKARA LA. Las condiciones de amplificación fueron: 1 min a 94 °C y 30 ciclos de 5 seg a 98 °C, 1 min a 58 °C y 15 min a 68 °C. El tamaño del fragmento obtenido fue de 8720 pb aproximadamente (la longitud del genoma completo de VLB) (ver Figura 11).



**Figura 11. Estrategia de amplificación 1.** En la figura se observa la estrategia diseñada a fin de amplificar el genoma completo de VLB en un solo fragmento. Las flechas y óvalos verdes indican los oligos específicos (sentido y antisentido) utilizados (denominados 1F y 20R , respectivamente).Mediante esta estrategia se logra la amplificación de un fragmento de 8720pb.

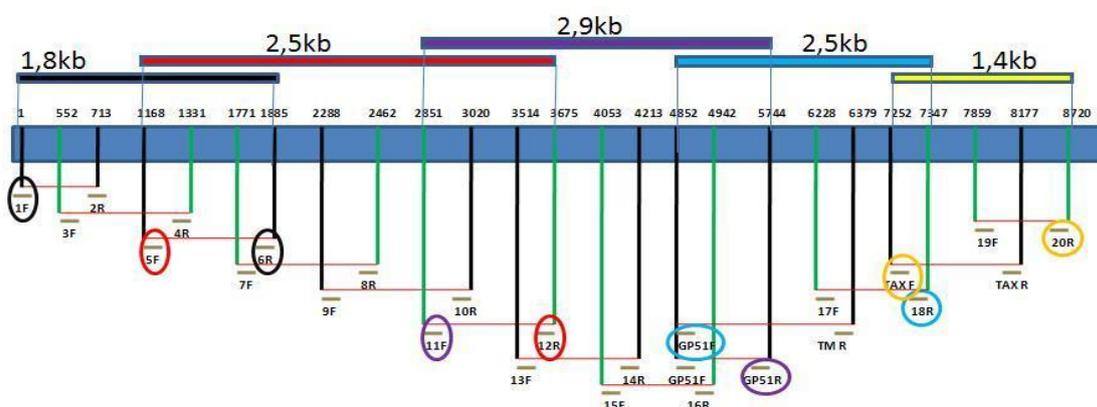
La segunda estrategia consta de 2 juegos de primers, el primero 1F - 5' TGT ATG AAA GAT CAT GCC GAC 3' y GP51 R - 5'-CGA CGG GAC TAG GTC TGA CCC- 3 y el segundo GP51 F-5'-ATG CCY AAA GAA CGA CGG-3' y 20R- 5' CTC TCC TGG CCG CTA GAG GGC 3'. En esta, se utiliza la enzima PHUSION de New England Biolabs. Las condiciones de amplificación fueron: 30 seg a 98 °C y 35 ciclosde 10 seg a 98 °C, 30 seg a 64 °C y 3 min a 72 °C. El tamaño de los fragmentos obtenidos es de 5744 pb y 3890 pb aproximadamente (ver Figura 12).



**Figura 12. Estrategia de amplificación 2.** En la figura se observa la estrategia diseñada a fin de amplificar el genoma completo de VLB en dos fragmentos solapados. Las flechas y óvalos indican los oligos específicos (sentido y antisentido). Mediante esta estrategia se logra la amplificación de dos fragmentos solapados de 5744pb y 3890pb.

Por último la tercera estrategia se basó en la amplificación del provirus de VLB en 5 fragmentos genómicos, para la misma se utilizaron los siguientes oligos: 1F-6R (tamaño de amplicón de 1,8kb); 5F-12R (2,5kb); 11F-GP51R (2,9kb); GP51F-18R (2,5kb) y TaxF-20R (1,4kb), ver Figura 13. Se utilizó un termociclador en gradiente de temperatura, las condiciones de amplificación fueron: 30 seg a 98°C seguido de 30

ciclos de 10 seg a 98°C (desnaturalización), 30 seg a 52°C (para el fragmento 1F-6R) y a 60°C (para los cuatro fragmentos restantes) (annealing), y 3 min a 72°C (extensión) seguido de una etapa de extensión final de 10 min a 72°C.



**Figura 13. Estrategia de amplificación 3.** En la figura se observa la estrategia diseñada a fin de amplificar el genoma completo de VLB en cinco fragmentos solapados. Los oligos específicos utilizados para la amplificación de cada segmento se encuentran marcados con óvalos de colores que se corresponden con los colores de los fragmentos amplificados observados en la figura. Mediante esta estrategia se logra la amplificación de cinco fragmentos solapados de 1,8Kb; 2,5Kb; 2,9Kb, 2,5Kb y 1,4Kb.

Todas las PCRs fueron realizadas en un volumen final de 50µl conteniendo: 10 µl de buffer Phusion 5x, 1 µl de dNTPs 10mM (Fermentas®), 1µl de cada juego de los oligonucleótidos anteriormente mencionados en concentraciones de 10µM cada uno, 0,5µl de enzima PHUSION de New England Biolabs 5U/µl, exceptuando la estrategia de amplificación en un solo fragmento en donde se utilizó la enzima TAKARA LA, como se mencionó anteriormente. Fue necesario utilizar 200ng de ADN (1,5µl) proveniente de cada linfosarcoma par la realización de cada una de las reacciones d PCR. Para completar el volumen final se agregaron 35µl de agua destilada filtrada Milli-Q.

#### 5.4.4 Clonación y secuenciación de genomas completos de VLB

Los amplicones obtenidos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, posteriormente purificados mediante el kit *QIAquick PCR Purification* de QIAGEN, y clonados en vectores *pGEM-T Easy* (Promega, EE.UU.). Luego se transformaron células *Escherichia coli XL1-Blue* por electroporación (BTX Electroporador, Genetronics Biomédica Ltd). Las colonias positivas se crecieron y posteriormente se purificaron los plásmidos utilizando el kit *GFX DNA purification kit* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU.). Se secuenciaron ambas hebras de los plásmidos purificados utilizando los oligos universales T7 y SP6 mediante el kit *Big Dye DNA sequencing kit* (Perkin-Elmer) en un secuenciador *373 DNA Sequencer* (Perkin-Elmer). Para ver protocolos detallados de esta metodología referirse al punto 4.4.9)

Para la secuenciación del genoma completo se emplearon oligonucleótidos internos, los cuales fueron diseñados para la realización de este trabajo (ver Tabla 3). (Para ver protocolo detallado de esta metodología referirse al punto 4.4.10)

**Tabla 3.** En la tabla se observa el nombre de los oligos diseñados y utilizados para la amplificación y secuenciación del genoma completo de VLB. También se denota la secuencia y polaridad de los mismos.

<b>Oligos</b>	<b>Secuencias</b>	<b>Nucleótidos</b>	<b>Polaridad</b>
01 F	tgatgaaagatcatgccgac	1-21	sentido
02 R	agccttgcgcgcttgvvgag	692-713	anti sentido
03 F	attgatcaccccggaacccta	552-572	sentido
04 R	ggagattttccaggcctgaagcc	1308-1331	anti sentido
05 F	atgaccagcctaacggcagca	1168-1188	sentido
06 R	ctaattcgggtccactaagag	1865-1885	anti sentido
07 F	ttcccattggaaacgagactg	1771-1791	sentido
08 R	atttggttcgtaaccggaa	2442-2462	anti sentido
09 F	cgagccaattggattagaac	2288-2308	sentido
10 R	aattgggga tgagatctgcaa	3000-3020	anti sentido
11 F	ggtcacaatgtta tcaagccc	2851-2871	sentido
12 R	aata tgctcctcgtcctgtag	3655-3675	anti sentido
13 F	aattgtggccccagatttct	3514-3534	sentido
14 R	tgggttata tccgcctgccaa	4193-4213	anti sentido
51 F	atgccyaaagaacgacgg	4873-4849	sentido
15 F	ttgtctgatggccgaacca	4053-4073	sentido
16 R	ggagcatctccaagtctggat	4922-4942	anti sentido
51 R	cga cgggactaggctgaccc	5724-5744	anti sentido
17 F	agctcctccggcaggctccc	6228-6247	sentido
TM R	tcaagggcagggtcggagg	6361-6379	anti sentido
TAX F	caagtgttggttgggggcc	7259-7280	sentido
18 R	ggcaccaggcatcgatgggtg	7328-7347	anti sentido
19 F	attctaccctaggcgagcc	7853-7878	sentido
TAX R	ccaagcttcaaaaaaggcgggagagc	8156-8177	anti sentido
20 R	ctctcctggccgctaaggggc	8700-8720	anti sentido

#### 5.4.5 Análisis Bioinformáticos

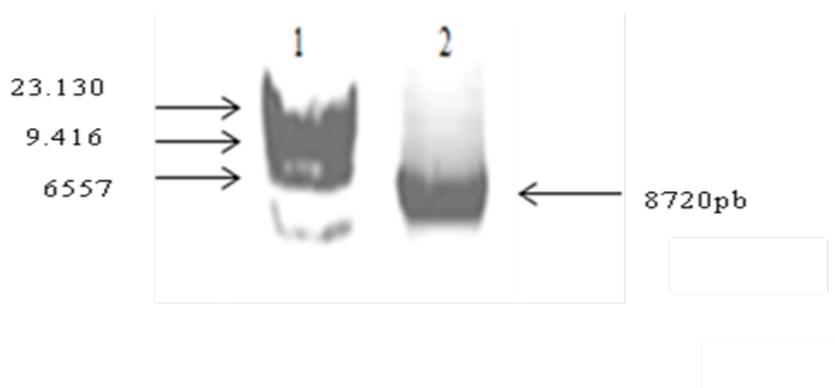
Las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias previamente descritas, provenientes de Genbank, EMBL y DDBJ, utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Se analizaron exhaustivamente posibles eventos de recombinación utilizando dos aproximaciones implementadas en el programa SimPlot (Lole et al., 1999): a) un análisis de ventana basado en distancia y b) bootscanning (Salminen et al., 1995). El programa Modelgenerator (Keane et al., 2006) fue utilizado para determinar el mejor modelo evolutivo que represente los datos de secuencia obtenidos (utilizaremos como criterio los resultados obtenidos utilizando Akaike Information Criteria y Hierarchical Likelihood Ratio Test). Una vez determinado el modelo evolutivo, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (maximum likelihood) utilizando el programa PhyML (Guindon et al., 2005), utilizando tanto los genomas completos como diferentes genes virales. Como medida de fiabilidad de los árboles filogenéticos obtenidos, utilizamos el método de bootstraps. A efectos de observar motivos específicos de secuencias de aminoácidos, las secuencias de nucleótidos obtenidas se tradujeron automáticamente utilizando el programa MEGA 5 (Kumar et al., 2006). A efectos de determinar probables secuencias características de determinados clusters o secuencias particulares (sequence signatures), éstas fueron analizadas utilizando el método de Korber & Myers, tal como está implementado en el programa VESPA y que anteriormente nuestro grupo a utilizado (Korber & Myers, 1992; Moratorio et al., 2007).

## 5.5 Resultados y discusión

### 5.5.1 Amplificación del genoma completo de VLB

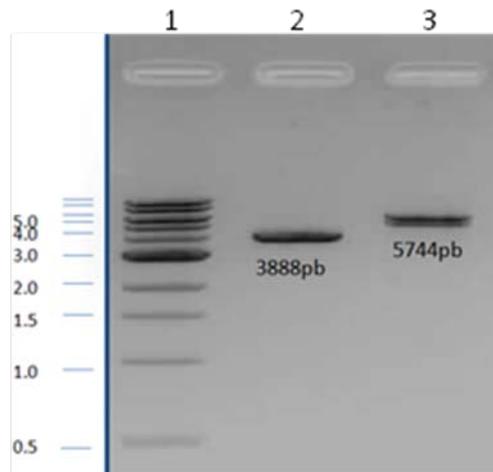
Como mencionamos anteriormente se desarrollaron tres estrategias diferentes para la amplificación de los genomas completos de VLB.

Como podemos observar en la figura 14, la primera estrategia permitió amplificar los 8720 pb correspondientes al genoma completo de VLB en una única PCR mediante la utilización de un único juego de primers externos y la enzima TAKARA LA



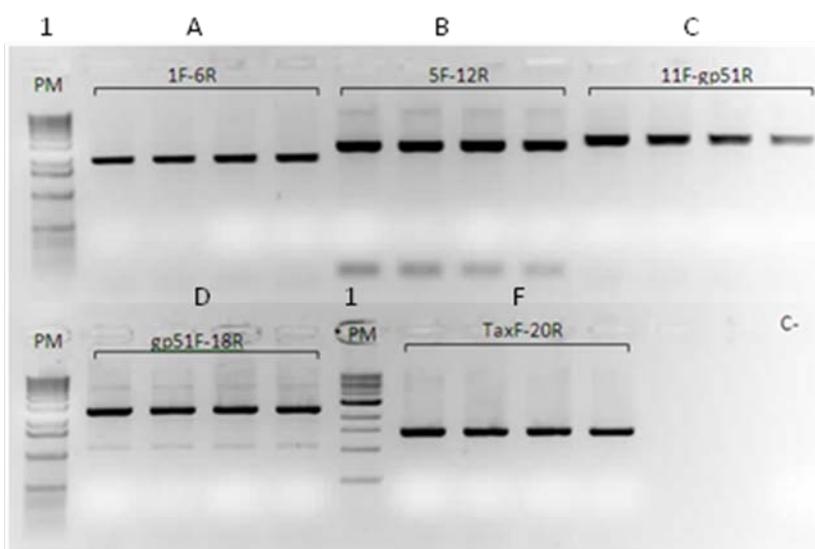
**Figura 14. Amplificación del genoma completo de VLB .** En la figura se observa un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III, carril 2: fragmento amplificado de 8720pb correspondiente al genoma completo de BLV

La segunda estrategia de amplificación del genoma completo de BLV, se basó en la utilización de 2 juegos de primers y en la utilización de la enzima PHUSION de New England Biolabs. Mediante esta estrategia se logró la amplificación del genoma de BLV en dos amplicones solapados. El tamaño de los fragmentos obtenidos es de 5744 pb y 3890 pb aproximadamente (ver Figura 15).



**Figura 15. Amplificación del genoma completo de VLB en dos fragmentos solapados.** En la figura se observa un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1KB, carril 2: fragmento amplificado de 3888pb, carril 3 fragmento amplificado de 5744pb.

Por último la tercera estrategia se basó en la amplificación del provirus de VLB en 5 fragmentos genómicos solapantes, para la misma se utilizaron 5 pares de oligos específicos. En la figura 16 se observa el resultado de esta estrategia.



**Figura 16. Amplificación del genoma completo de VLB en cinco fragmentos solapados.** En la figura se observa un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 1Kb, en el carril A se observa los amplificados de 1,8Kb, utilizando los oligos 1F y 6R; en el carril B se observa los amplificados de 2,5Kb utilizando los oligos 5F y 12R; en el carril C se observan los amplificados de 2,9 Kb, obtenidos con los oligos 11F y gp51R; en el carril D se observan amplificados de 2,5Kb, obtenidos con gp51F Y 18R y en el carril F se puede observar los amplicones de 1,4Kb que se obtienen con TaxF y 20R. El carril C- corresponde al control negativo de la amplificación 1F-6R.

### 5.5.2 Análisis filogenético de cepas de VLB utilizando genomas completos

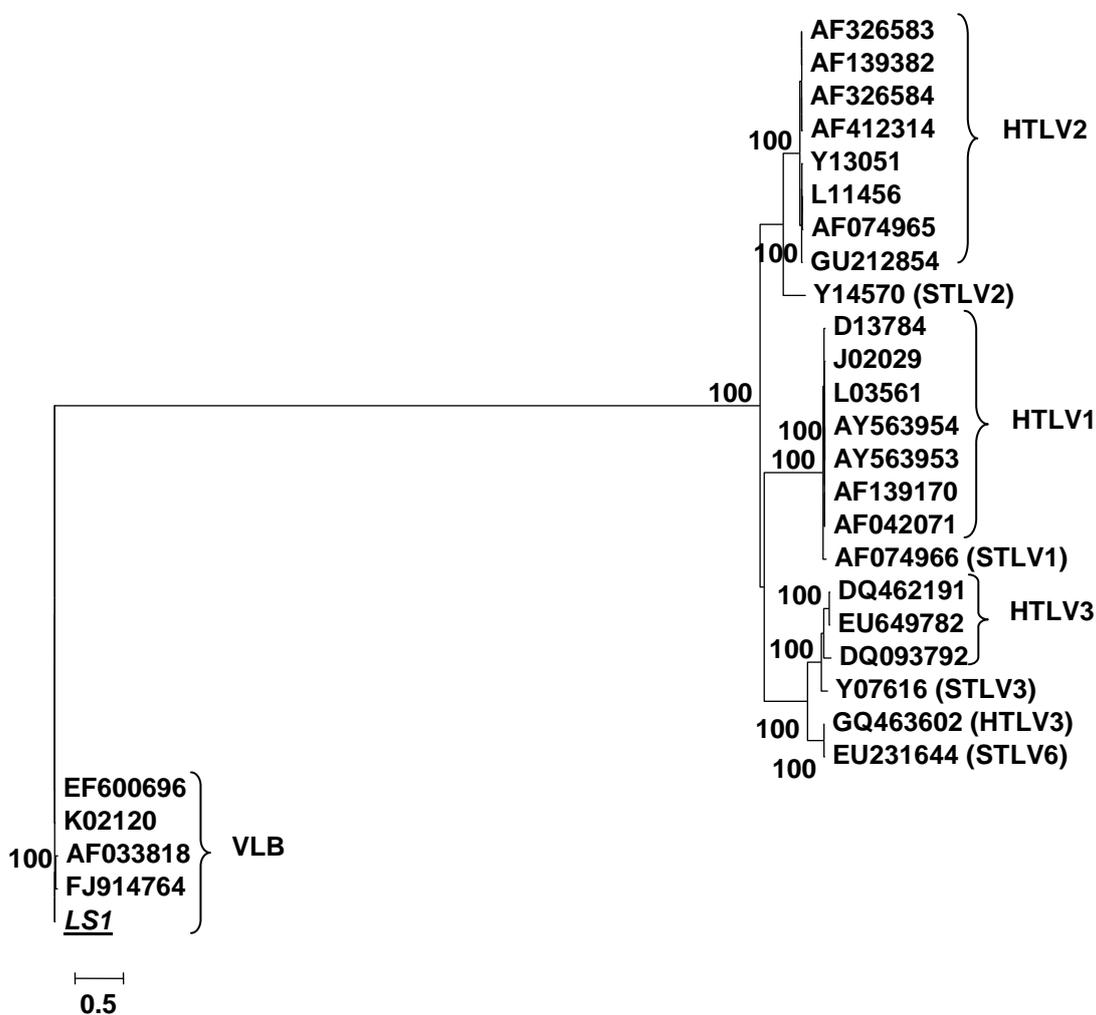
Con el objetivo de establecer el grado de variabilidad genética existente entre cepas de VLB aisladas de PBMC y otros orígenes, así como de tumores (obtenidas en este trabajo), se realizaron estudios comparativos utilizando todas las secuencias de genomas completos disponibles en la base de datos. Como se aprecia en la Tabla 4, todas las cepas de VLB comparten una estrecha relación genética entre sí. Sin embargo, se pueden observar diferencias entre las distintas cepas y diferentes regiones del genoma de VLB.

**Tabla 4.** Similaridad nucleotídica y aminoacídica de otras cepas de referencia de VLB con respecto a la estirpe Uruguaya de VLB, extraída de linfosarcoma <sup>a</sup>

	<b>EF600696</b>	<b>FJ914764</b>	<b>K01220</b>	<b>AF033818</b>
Genoma	99.4	96.9	99.1	96.7
LTR	99.7	97.6	99.5	N D
<i>Gag</i>	99.4(99.2)	96.4(97.9)	98.8(98.4)	95.7(97.9)
<i>Pol</i>	99.2(99.3)	97.1(98.4)	98.9(98.4)	97.1(98.7)
<i>Env</i>	99.4(99.6)	96.8(96.9)	99.1(99.2)	96.6(97.5)
Rex	99.8(99.4)	98.2(97.0)	100.0(100.0)	98.4(96.4)
Tax	99.4(99.4)	97.7(97.4)	99.4(99.4)	96.7(96.4)

<sup>a</sup> La similitud es mostrada en porcentaje, la similitud aminoacídica es mostrada entre paréntesis. N.D: No disponible

Como abordaje para profundizar en el conocimiento acerca de la evolución del género *Deltaretrovirus*, así como para establecer las relaciones genéticas definitivas entre las cepas de VLB y los miembros de este género, se realizaron análisis filogenéticos utilizando secuencias del genoma completo. Una de nuestras secuencias fue alineada con todas las secuencias disponibles de genomas completos de miembros del género *Deltaretrovirus*. Se procedió luego a la construcción de árboles de máxima verosimilitud, utilizando la aproximación aLRT como medida de robustez de cada nodo. Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 17. Todas las cepas se agrupan en el árbol de acuerdo al tipo de virus, con altos valores de aLRT en cada caso. Estos estudios revelan una marcada diversificación genética entre VLB y los demás miembros del género *Deltaretrovirus*. Se aprecia también una estrecha relación genética entre virus HTLV y STLV, y una relación más distante con el clado de VLB (ver Fig. 17).



**Figura 17.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando secuencias del genoma completo de cepas de **Deltaretrovirus**. En esta figura se observa las secuencias de las cepas previamente descritas por el numero de acceso y a la derecha de cada cepa se indica al virus que pertenece (HTLV, STLV and VLB). Las cepa de VLB aislada de linfosarcoma se indican por el nombre en *itálica*. El numero cada uno de los nodos muestra el valor de aLRT. La barra en la parte inferior del árbol denota distancia.

### 5.5.3 Análisis comparativo de la región 5'-LTR de secuencias de VLB de cepas aisladas a partir de diferentes orígenes y de linfosarcomas.

VLB inicia la transcripción en la unión U3-R de 5'-LTR y es inducida por Tax (Derse, 1987). La transactivación requiere la presencia de tres elementos potenciadores de 21 pb (llamados elementos de respuesta a Tax, TxREs) ubicados en la región U3 del 5'-LTR (Adam et al., 1994). Cada TxRE contiene una secuencia central, de repetidos de 8 nucleótidos, que corresponde a un elemento de respuesta a AMP-cíclico (CRE) relativamente conservado, que se une a factores celulares de transcripción como la proteína de unión a CRE (CREB), la isoforma moduladora de CRE (CREM $\tau$ ), y factores de activación de la transcripción 1 y 2 (ATF-1 y ATF-2) (Nguyen et al., 2007). Cada TxRE también contiene una secuencia de *caja E* (*E-box*), con superposiciones de cada uno de los tres motivos CRE (Calomme et al., 2004). Los sitios *E-box* se unen a proteínas que pertenecen a la familia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice básicos (bHLH), como c-Myc, Max, USF, o TFE3 (Calomme et al., 2002; Massari y Murre, 2000). Un segmento que contiene sitios de unión de miembros de la familia de proteínas NF- $\kappa$ B también se ha encontrado en esta región (Brooks et al., 1995). La región U3 también contiene un sitio de unión a PU.1/Spi-B (ETS específico de células B y macrófagos, miembro de la familia de proteínas que regulan la transcripción de numerosos retrovirus) (Dekoninck et al., 2003) y un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Xiao y Buehring, 1998). Además, la expresión de VLB está regulada por secuencias 5'-LTR ubicadas corriente abajo del sitio de iniciación de la transcripción: secuencias activadoras corriente abajo (DAS) de 64 pb, ubicadas en el extremo 3' de la región R (Kiss-Toth y Unk, 1994) y un sitio de unión a factores reguladores de interferón en la región U5 (Kiermer et al., 1998). Todas las posiciones de estos elementos presentes en 5'-LTR de VLB se pueden apreciar en la Figura 18.

Se compararon las secuencias 5'-LTR de las cepas de VLB obtenidas a partir de linfosarcomas, con todas las cepas disponibles de VLB aisladas a partir de PBMC, FLK y de otros orígenes para las que se conoce su genoma completo. Este estudio reveló que esta región del genoma se encuentra altamente conservada entre las diferentes estirpes de VLB en estudio (Fig. 18). La única diferencia significativa entre nuestras

secuencias y las cepas aisladas a partir de otros orígenes fue una sustitución encontrada en el tercer elemento potenciador de esta región y en el sitio de unión GRE (Fig. 18). Previamente se ha determinado que GRE confiere capacidad de respuesta a los glucocorticoides como la dexametasona en presencia del transactivador Tax (Niermann y Buehring, 1997). En ausencia de Tax, mutaciones de GRE disminuyen significativamente la actividad basal del LTR (Xiao y Buehring, 1998). Esto plantea la hipótesis de que estas alteraciones pueden haber permitido un mejor silenciamiento de la transcripción viral de las cepas de linfosarcoma, como una estrategia para permitir el escape al reconocimiento por parte de la respuesta inmune del hospedero (Merezak et al, 2001; Xiao y Buehring, 1998).

1 50 CRE E Box CRE E Box 100  
 LS1 TGTATGAAAGATCATGCCGACCTAGGCGCCGCCACCGCCCCGTAAACAGACAGAGACGTCAGCTGCCAGAAAGCTGGTGACGGCAGCTGGTGGCTAG  
 LS2 .....  
 EF600696 .....  
 FJ914764 .....G.....T.....A.....  
 K02120 .....A.....  
 AF257515 .....G.....T.....A.....

CAT Box PU.1/Spi-B GRE 150 CRE E Box PROMT PAS 200  
 LS1 AATCCCCGTACCTCCCAACTTCCCCTTTCCCGAAAAATCCACAACCTAAGCTGCTGACCTCACCTGCTGATAAATTAATAAAATGCCGGCCCTGTCTCGA  
 LS2 .....  
 EF600696 .....G.....  
 FJ914764 .....G.....  
 K02120 .....G.....  
 AF257515 .....G.....

CAP SITE U3 | -R 250 300  
 LS1 GTTAGCGGCACCAGAAGCGTTCTTCTCCTGAGACCCTCGTGCTCAGCTCTCGGTCCTGAGCTCTCTTGCTCCCGAGACCTTCTGGTCGGCTATCCGGCA  
 LS2 .....  
 EF600696 .....  
 FJ914764 .....T.....C..  
 K02120 .....  
 AF257515 .....T.....C..

350 DAS E Box 400  
 LS1 GCGGTCAGGTAAGGCAAACCACGGTTTGGAGGGTGGTTCTCGGCTGAGACCACCGCGAGCTCTATCTCCGGTCTCTGACCGTCTCCACGTGGACTCTC  
 LS2 .....  
 EF600696 .....  
 FJ914764 .....G.....  
 K02120 .....G.....  
 AF257515 .....G.....

450 R | -U5 IRF 500  
 LS1 TCCTTTGCCTCCTGACCCCGCGCTCCAAGGGCGTCTGGCTTGCACCCGCGTTTGTTCCTGTCTTACTTTCTGTTTCTCGCGGCCCGCGCTCTCTCCTT  
 LS2 .....  
 EF600696 .....  
 FJ914764 ..TC.....C.....G.....T..

```

K02120 .....
AF257515 ..TC.....C.....G.....G.....T...
                                     550

                                U5|→ tRNAPro Bind site                                600
LS1      CGGCGCCCTCTAGCGGCCAGGAGAGACCGGCAAACAAT TGGGGGCTCGTCCGGGAT TGATCACCCCGGAACCCTAACAACTCTCTGGACCCACCCCTC
LS2      .....
EF600696 .....T.....
FJ914764 .....T.....
K02120   .....
AF257515 .....TC.....T.....
          600
LS1      GCGCGCATTTTGGGTCTCTCCTTCAAATTATATC
LS2      .....
EF600696 .....
FJ914764 .....G.....T.....
K02120   .....
AF257515 .....G.....T.....CT

```

**Figura 18. Análisis comparativo de la región 5'-LTR de secuencias de VLB de cepas aisladas a partir de diferentes orígenes y de linfomas.** En la figura se pueden observar los alineamientos correspondientes a secuencias nucleotídicas pertenecientes a cepas VLB aisladas de linfoma (LS1 y LS2) y a cepas aisladas de diferentes orígenes. EF600696 (FLK, línea celular persistentemente infectada); FJ914764 (corresponde a una cepa proveniente de una infección experimental de una oveja con una estirpe Argentina); AF257515 (estirpe Argentina obtenida de PBMC); K02120 (Japonesa, extraída PBMC)

#### **5.5.4 Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales de cepas de VLB reportadas y cepas aisladas de linfosarcomas.**

Con el objetivo de investigar las posibles diferencias a nivel proteico entre las cepas de VLB aisladas de linfosarcoma, con respecto a las aisladas de diferentes orígenes como ser PBMC, FLK o animales de experimentación, se alinearon las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales *gag*, *pro*, *pol*, y *env* de las cepas secuenciadas para este estudio con secuencias correspondientes de cepas de VLB aisladas de otros orígenes y reportadas en la base de datos. Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 19.

El proceso de empaquetamiento del ARN genómico en *Retrovirus* implica un evento de reconocimiento del genoma viral por el precursor de la poliproteína *gag* viral (PrGag), que inicia la morfogénesis de las partículas virales (Jewell y Mansky, 2000). Gag incluye tres dominios principales: la matriz (p15-MA), la cápside (p24-CA) y la nucleocápside (p12-NC) (véase en la Figura 19-A.). Las proteínas NC de todos los *Retrovirus* comparten la característica de tener un alto porcentaje de residuos básicos y dominios de dedos de zinc involucrados en el empaquetamiento de ARN. Estudios previos han demostrado que las sustituciones en muchos residuos de aminoácidos básicos y todos los residuos en los dominios de los dedos de zinc en NC de PrGag de VLB, reducen significativamente el empaquetamiento del ARN (Wang et al., 2003).

Se puede apreciar que los dedos de zinc y los aminoácidos básicos se encuentran bien conservados entre todas las estirpes involucradas en este estudio. No obstante, una sustitución de una Prolina a una Serina (P340S) se observa en la proteína NC de las dos 2 estirpes aisladas de linfosarcoma (Figura 19-A). Previos trabajos han demostrado que los residuos de MA y NC interactúan directamente con la señal de empaquetamiento de ARN en VLB, o tal vez son secuencias adyacentes las que pueden influir en el reconocimiento del genoma viral (Wang et al., 2003). La interacción de NC con secuencias de ARN distintas a estas estructuras secundarias de ARN, ha sido observada en otros *Retrovirus*, como en el virus de la leucemia murina (MLV) y el virus

de la necrosis del bazo (SNV). Estas interacciones desempeñan un papel importante en el empaquetamiento de estos virus de ARN (Beasley y Hu, 2002; D'Souza et al, 2001).

Todos los *Retrovirus* competentes para la replicación, como VLB, codifican una proteasa aspártica (PR) (Leis et al., 1988). Previamente se ha establecido un modelo molecular de la PR de VLB, así como también su especificidad de sustrato, tipos de sitios de clivaje y su sensibilidad a inhibidores (Sperka et al., 2007).

Podemos apreciar en la Figura 19-B una comparación de la secuencia aminoacídica de PR de la cepas obtenidas en este trabajo (LS1 y LS2), con la de todas las otras cepas VLB analizadas en este estudio. Como puede observarse solo hay una sustitución en común entre las estirpes aisladas de linfosarcoma (V165I) y las demás cepas en comparación. Sin embargo, estas sustituciones no están relacionados con los sitios involucrados en las interacciones con los átomos de la cadena principal de residuos que formen sitios de clivaje involucrados en la función de la PR de VLB (Sperka et al, 2007; Bagossi et al, 2005). Además, diferentes sustituciones pueden observarse entre las estirpes de LS1 y LS2 en la posición 37 y 38 de la PR (ver figura 19B).

Dos sustituciones de aminoácidos pueden encontrarse en el gen *pol* de las cepas LS1 y LS2, en comparación con las cepas de VLB aisladas a partir de otros orígenes. Una de ellas se ubica en la región de la RT (T377A), mientras que la otra se encuentra en la región endonucleasa (S573P) (Fig. 19-C). Lamentablemente, la estructura de la polimerasa de VLB, como la de otros *Deltaretrovirus* relacionados como HTLV-1, es actualmente desconocida. Más estudios serán necesarios para establecer los efectos que estas sustituciones pueden causar en la fidelidad o procesividad de la polimerasa de VLB.

La proteína de envoltura de los *Retrovirus*, que es sintetizada a partir del gen *env*, le confiere a éstos la capacidad de infectar las células del hospedero. Sus oligómeros se unen a receptores de superficie de la célula blanco y median la entrada de su genoma viral. El complejo proteico Env se compone de las subunidades de gp 51, la glicoproteína de superficie (SU), que se ancla a los viriones mediante su asociación con las subunidades de la proteína transmembrana gp 30 (TM). Las moléculas SU

reconocen a los receptores celulares y se unen a ellos iniciando de esta forma cambios conformacionales que conducen a la fusión de la membrana viral y celular, mediante los oligómeros de TM (Wallin et al., 2004). La proteína Env se dispone en la superficie del virus de forma trimérica, con 3 subunidades SU asociadas mediante enlaces disulfuro a las 3 subunidades de TM (Lamb et al., 2011).

Estudios previos han demostrado que la región N-terminal de la gp 51-SU madura juega un papel importante en la infectividad del virus y en la formación de sincitios (Bruck et al., 1982a; Portetelle et al., 1989). Además, estos estudios han indicado que esta región puede también contener el dominio de unión al receptor (RBD), al igual que los RBD de los miembros del género *Gammaretrovirus* (Johnston et al., 2002). Esta región de SU forma epítopes conformacionales F, G y H (Bruck et al., 1982b), seguido por el fuerte giro estructural GYPD que es conservado en todos los *Retrovirus* oncogénicos (Gallaher et al., 1995). Este motivo separa la región de epítopes conformacionales del extremo C terminal de gp 51, que contiene los epítopes lineales A, B, D y E (Ban et al., 1992; Callebaut et al., 1991) (ver Figura 19-D). La comparación de la proteína Env de las cepas LS1 y LS2, con respecto a cepas de VLB aisladas de PBMC y otros orígenes, revela una sustitución ubicada en un epítope conformacional de SU (D134N), más específicamente en una región previamente relacionada en la neutralización, denominada Segundo dominio de neutralización (Johnston et al., 2002; Callebaut et al., 1993;) (ver Fig. 19-D). Asimismo, se ha demostrado que esta región puede contener también el RBD, análogo al RBD de los miembros del género *Gammaretrovirus* (Johnston et al., 2002).

(A)gag

	1	<b>P15-MA</b>	50		100
LS1	MGNSPSYNPPAGISPSDWLNLQSAQRLNPRPSPSDFTDLKNYIHWFHKTQKKPWTFSTGGPTSCPPGRFGRVPLVLATLNEVLSNDGGAPGASAPEEQP				
LS2	.....				
EF600696	.....				
AF033818	.....R.....A.....K.....E.....				
FJ914764	.....Y.....S.....T.....				
K02120	.....E.....				
AF257515	.....Y.....S.....T.....				
	101	<b>P24-CA</b>	150		200
LS1	PPYDPPAVLPI ISEGNRRNRHRAWALRELQDIKKEIENKAPGSQVWIQTLRLAILQADPTPADLEQLCQYIASPVDQTAHMTSLTAAIAAAEAANTLQGFN				
LS2	.....				
EF600696	.....				
AF033818	.....I.....				
FJ914764	.....				
K02120	.....I.....-				
AF257515	.....V.....				
	201		250		300
LS1	PQNGTLTQOSAQPAGDLRSQYQNLWLQAWKNLPTRPSVQPWSTIVQGPAESYVEFVNRLQISLADNLPDGVKPEIIDSLSYANANKECQQILQGRGLV				
LS2	.....				
EF600696	.....				
AF033818	.....				
FJ914764	.....S.....				
K02120	.....-.....S.....-.....R.....-				
AF257515	.....				
	301	<b>P12-NC</b>	<b>350Zn finger</b>	<b>Zn finger</b>	
LS1	AAPVGQKLQACAHWAPKMKQPAILVHTPGPKMPGPRQPASKRPPPGPCYRCLKEGHWARD_CPTKATGPPPGPCPIC_KDPSHWKRDCPTL_KSKN				
LS3	.....				
EF600696	.....V.....V.....P.....				
AF033818	.....V.....P.....T.....				
FJ914764	.....I.....P.....T.....L.....				
K02120	..--.....L.....P.....				
AF257525	.....I.....P.....T.....L.....				

**(B)pro**

	1	50	100
LS1	RSFPLETRLSNPQIKKLI	EGGLSAPQTITPITD	SLSGTELECLLSIPLARSRPSVAVYLSGPWLQPSQNQALMLVDTG <u>AE</u> <u>NT</u> <u>VL</u> PQNWLVRDYPRI <u>PA</u> <u>AV</u>
LS2	.....	<b>EA</b>	.....
EF600696	.....	<b>EA</b>	.....
AF033818	.....	V.....P.....	<b>EA</b> .....
FJ914764	.....	T.....	<b>EA</b> .....R.....T.....
K02120	.....	<b>EA</b>	.....
AF257525	.....	T.....	<b>EA</b> .....E.....T.....

	101	150
LS1	L <u>G</u> A <u>G</u> G <u>V</u> S <u>R</u> <u>N</u> RYNWLQGPLTLALKPEGPFITIPKI <u>L</u> VDTFDKWQ <u>I</u> LGRDVLSRLQASISIP <del>EE</del> IRPPVVG	
LS2	.....	.....
EF600696	.....	<b>V</b> .....
AF033818	.....	<b>V</b> ...M...
FJ914764	.....	<b>VP</b> .....
K02120	.....	S..... <b>V</b> .....
AF257515	.....I.....S...L...I.....	<b>V</b> .....

**(C)pol**

	1	Reverse transcriptase	50	100
LS1	GASIPFKLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRATNALTKPIPALSPGPPDLTAIPHTLPHIICLDLKDAFFQIPVED			
LS2	.....			
EF600696	.....			
AF033818	.T.		T.	.....
FJ914764	.T.	L.	T.	.....
K02120	.....			P.
AF257515	.T.		T.	R.PP.....
	101	150	200	
LS1	RFRSYFAFTLPTPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFERALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILIASPTEEQRSQCYQALAAARLRDLGFQVASEKTRQ			
LS2	.....			
EF600696	.P.	.....		
AF033818	.....			
FJ914764	.....			T.
K02120	.F.	LS.	S.	.....Y.....S.
AF257515	.....			T.
	201	250	300	
LS1	TPSPVPFLGQMVHEQIVTYQSLPTLQISSPISLHQLQAVLGDLQWVSRGTPTRRPLQLLYSSLKGIDDPRAIQLSPEQLQGI AELRQALSHNARSRYN			
LS2	.....			
EF600696	.....			
AF033818	.N.	.....		
FJ914764	.....			L.
K02120	.....			-
AF257515	.....			L.
	301	350	400	
LS1	EQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLLGCQYLQTQALSSYAKPILKYHNLPKASLDNWIQSSDPRVQELLQLWPQ			
LS2	.....			
EF600696	.....			T.
AF033818	.....			T.
FJ914764	.....			T.
K02120	.....			T.
AF257515	.....			V.TF.....C.

	401		450		500
LS1	ISSQGIQPPGPWKTLITRAEVFLTPQFSPDPIPAALCLFSDGATGRGAYCLWKDHLDFQAVPAPESAQKGELAGLLAGLAAAPPEPVNIWVDSKYLSL				
LS2	.....K.....				
EF600696	.....				
AF033818	.....E.....L.....				
FJ914764	.....E.....L.....				
K02120	.....				
AF257515	...V.....E.....L.....				

	501		550	endonuclease	600
LS1	LRTLVLGAWLQDPVPSYALLYKSLLRHPAIFVGHVRSASSASHPIASLNHYVDQLLPLETPEQWHKLTHCNPRALSRWPNPRISAWDPRSPATLCETCQ				
LS2	.....				
EF600696	.....N.....S.....V.....				
AF033818	.....S.....				
FJ914764	.....S.....				
K02120	.....V.....S.....				
AF257515	...V.....S.....V.....				

	601		650		700
LS1	KLNPTGGGKMRTIQRGWAPNHIWQADITHYKYKQFTYALHVFVDITYSGATHASAKRGLTQMTIEGLLEAIVHLGRPKKLNTDQGANYTSKTFVRFCCQF				
LS2	.....				
EF600696	.....R.....				
AF033818	R.....				
FJ914764	.....R.A.....				
K02120	.....T.....				
AF257515	.....R.A.....				

	701		750		800
LS1	GVSLSHHVPYNPTSSGLVERTNGLLKLKLLSKYHLDEPHLPMTQALSRAWTHNQINLLPILKTRWELHHSPLAVISEGGETPKGSDKLFYKLPQNNR				
LS2	.....				
EF600696	.....				
AF033818	.I.....				
FJ914764	.....I.....				
K02120	.....D.....L.....				
AF257515	.....I.....				

801

850

LS1	RWLGPLPALVEASGGALLATDPPVWVPWRLKAFKCLKNDGPEDAHNRSSDG
LS2	.....
EF600696	.....
AF033818	.....N.....P.....
FJ914764	.....I.....P.....
K02120	.....
AF257515	.....I.....P.....

**(D)env**

|→ conformational epitopes F,G,H

▶

1      Leader peptide      gp51      50      ND 100

LS1    MPKERRSRRRPQPIIRWVSLTLTLLALCRPIQTWRCSSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISIDQILEAHNQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWPPPQGRRRF

LS2    .....

EF600696    ..K.....

AF033818    .....Q.....T.....PR.....F.....

FJ914764    .....Q.T.....F.....

K02120    .....

AF257515    .....Q.....F.....F.....

Conformational epitopes F,G,H-

◀

101      ND      150CD8<sup>+</sup>-T Cell epitope      epitope E      200

LS1    GARAMVTYDCEPRCPYVGADRFDCPHWDNASQANQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPLITFSLHKIPDPPQDFPQLNSDWVPSVRSWAL

LS2    .....H.....S.....

EF600696    .....D.....

AF033818    .....H.....D.....

FJ914764    .....D.....D.....G.....

K02120    .....D.....

AF257515    .....D.....D.....

201      epitope B      epitope B'      250 epitopes D D'      TMHR      epitope A      300

LS1    LLNQATARAFPDCAICWEPSPPWAPAILVYNKTISSSGPGLALPDAQIFWVNTSSFNTTQGWHHPSQRLLFNVSQGNALLLPPISLVNLSLSTASSAPPTRVR

LS2    .....

EF600696    .....

AF033818    .....G.....L.....V.....

FJ914764    .....L.....I.....K.....

K02120    .....S.....

AF257515    .....L.A.....I.....V.....F.G.....GFF.....S.....K.....

```

301
|--gp30 Fusion peptide                                350                                GD21                                400
LS1  RSPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEODOORLITAINOTHYNLLNVASVVAONRRGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRTQND
LS2  .....
EF600696 .....
AF033818 .....
FJ914764 .....
K02120 .....
AF257515 .....S.....

401      LHR TM                                Membrane span450      |--cytoplasmic domain                                500
LS1  IIRLGDLPQRSQVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRETIHSVLSLFLLALFLLFLAPCLIKCLTSRLLKLLRQAPHFPEISLTPKPDSDYQALLPSAPEIYSH
LS2  .....
EF600696 .....
AF033818 .....FP.....
FJ914764 .....G.....ES.....FA.....R
K02120  ..LR.....
AF257515 .....G.....ES.....A.....R

501
LS1  LSPVKPDYINLRPCP
LS2  .....
EF600696 .....
AF033818 ...T.....
FJ914764 ...T.....
K02120 .....
AF257515 ...T.....

```

**Figura 19. Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales de cepas de VLB reportadas y cepas aisladas de linfosarcomas.** En la figura se puede observar los alineamientos de aminoácidos correspondientes a: A) *gag*; B) *pro*; C) *pol* y D) *env*. Al igual que en la figura 18, LS1 y LS2 corresponden a cepas aisladas de linfosarcoma, EF600696 (FLK, línea celular persistentemente infectada); FJ914764 (corresponde a una cepas proveniente de una infección experimental de una oveja con una estirpe Argentina); AF257515 (estirpe Argentina obtenida de PBMC); K02120 (Japonesa, extraída PBMC); AF033818 (USA- Belga , PBMC)

### **5.5.5 Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas no estructurales de cepas de VLB aisladas de linfosarcoma y otras disponibles.**

Además de los genes estructurales (*gag*, *pro*, *pol* y *env*), el provirus de VLB contiene una región llamada X, ubicada entre el gen *env* y el LTR 3', que codifica al menos cuatro proteínas: Tax, Rex, G4 y R3 (Van der Broeke et al., 1999).

Estudios previos sobre los dominios funcionales de la proteína Tax de VLB han identificado un presunto motivo de dedos de zinc (aminoácidos 30 a 53), un dominio transactivador (aminoácidos 157 a 197) y dos sitios de fosforilación (aminoácidos 106 y 293) (Willems et al, 1989; Willems et al, 1991) (véase la Fig. 20-A). Se han descrito una serie de mutantes de Tax de VLB con una mayor capacidad de estimular la transcripción dirigida por LTR, en comparación con la Tax salvaje (Tajima y Aida, 2000). Todos estos mutantes tienen sustituciones entre los aminoácidos 240 y 265 de Tax. Un mutante de Tax con una sustitución única (E303K) resultó ser defectuoso en la replicación (Van der Broeke et al., 1999). Ninguno de estos cambios aminoacídicos relacionados tanto con una mayor actividad transcripcional, como con una replicación defectuosa, fue observado en las cepas de VLB analizadas en estos estudios (ver Figura 20-A). Tampoco se observaron cambios en los sitios de fosforilación previamente descritos. La única sustitución encontrada en la cepa LS1, se encuentra fuera del dominio de activación rico en Leucinas (Figura 20-A). El posible efecto de esta sustitución aminoacídica sobre la transcripción o replicación de VLB es actualmente desconocido. Sin embargo, una variante de Tax con una fuerte actividad de transactivación podría ser una desventaja para la supervivencia y la expansión de VLB (Tajima y Aida, 2000). Estudios previos han revelado que el silenciamiento es fundamental para la progresión del tumor, y han identificado distintos mecanismos genéticos y epigenéticos para la supresión completa de la expresión de Tax en VLB. La conservación de sitios implicados en la supresión de la expresión viral puede ser un factor importante para la proliferación descontrolada de las células tumorales infectadas con VLB (Merimi et al. 2007).

Las proteínas Rex de los *Deltaretroviruses* actúan facilitando la exportación de ARN virales conteniendo intrones (Choi et al., 2005). Las proteínas Rev se transportan entre núcleo y el citoplasma mediante la señal de localización nuclear (NLS) y la señal de exportación nuclear (NES) (ver Figura 20-B). La NLS dirige la proteína Rev al núcleo excepto cuando se une a ARN viral. Esta unión enmascara la NLS, permitiendo que la NES dirija este ARN al citoplasma a través de los poros nucleares (Kim et al, 1996; Zapp et al, 1991). No se apreciaron sustituciones significativas en las proteínas Rev de todas las cepas de VLB analizadas (ver Figura 20-B).

Aunque el rol que cumplen las proteínas G4 y R3 no está del todo claro aún, éstas son de importancia para la propagación viral *in vivo* (Lefebvre et al., 2002a). Asimismo, se ha indicado que G4 presenta potencial oncogénico en células primarias correspondientes a fibroblastos de embriones de rata (REF) (Kerkhofs et al., 1998). La secuencia de aminoácidos de G4 incluye un tramo amino-terminal de residuos hidrofóbicos (aminoácidos 1 a 24) seguido de posibles sitios de clivaje proteolítico y una región rica en Argininas (aminoácidos 58 a 72), situada en el centro de la proteína (Alexandersen et al., 1993) (ver Figura 20-C). Esta última región es necesaria para la interacción de G4 con la sintetasa de pirofosfato de farnesilo (FPPS) (Lefebvre et al., 2002b). Esta enzima celular está implicada en la ruta que conduce a la prenilación de una variedad de proteínas incluyendo laminas nucleares, Ras y otras proteínas de unión a GTP, y varias quinasas y fosfatasas (Lefebvre et al., 2002b). La importancia biológica de la interacción G4-FPPS ha sido previamente demostrada en transformaciones celulares. Mutaciones en la hélice  $\alpha$  rica en Argininas de G4 impiden la immortalización de células primarias y la inducción de tumores en ratones atímicos (Lefebvre et al., 2002b). Por lo tanto, la interrupción de la interacción entre G4 y FPPS podría interferir en el proceso de oncogénesis.

Ninguna sustitución de aminoácidos fue encontrada en la hélice  $\alpha$  rica en Argininas de la proteína G4 de las cepas de VLB analizadas en estos estudios (ver Fig. 20-C). Sin embargo, se aprecia una sustitución aminoacídica (A29V) en las cepas aisladas de linfosarcoma (Figura 20-C). La posible implicancia de esta sustitución en la patogenia de VLB es aún desconocida.

La proteína R3 contiene 44 aminoácidos y se compone de una región hidrofílica N-terminal, seguida por una región hidrofóbica. Tanto en la cepa LS1 como en la LS2, se observó la presencia de un codón stop prematuro en esta proteína (aminoácidos 29 y 38, respectivamente) (ver Figura 20-D).

(A)tax

Zn finger

LS1 MASVVGWGP HSLHACPALVLSNDV TIDAWCPLCGPHERLQFERIDTTLTCE THRI NWTADGRPCGLNGTLFPRLHVSETRPQGPRRLWINCPLPAVRAQP  
LS2 .....  
EF600696 .....  
AF033818 ..... T ..... F .....  
FJ914764 ..... P ..... T ..... F ..... A .....  
K02120 .....  
AF257515 ..... H ..... T ..... F ..... A .....

157 Leucine-rich activation domain

LS1 GPVSLSPFERSPFQPYQCQLPSASSDGCPIIGHGLLPWNNLVTHPVLGKVLILNHMANFSLLP SFD TLLVDPLRLSVFAPDTRGAI RYLS TLLTLC PATC  
LS2 ..... Q .....  
EF600696 ..... R ..... Q .....  
AF033818 ..... Q ..... P ..... V .....  
FJ914764 ..... V ..... Q ..... P .....  
K02120 ..... Q .....  
AF257515 ..... V ..... Q ..... P.N .....

240 247 251 258261 265 287 297

LS1 ILPLGEPFSPNVPICRFPRDSNEPPLSEFELPLIQTPGLSWSVPAIDLFLTGPPSPCDRLHVWSSPQALQRF LHDPTLTWSELV ASRKIRLDSPLKLQLL  
LS2 .....  
EF600696 .....  
AF033818 ..... TS ..... Y ..... G.L .....  
FJ914764 ..... L .....  
K02120 ..... P .....  
AF257515 ..... L .....

303

LS1 ENEWLSRLF  
LS2 .....  
EF600696 .....  
AF033818 .....  
FJ914764 .....  
K02120 .....  
AF257515 .....

**(B)rex**

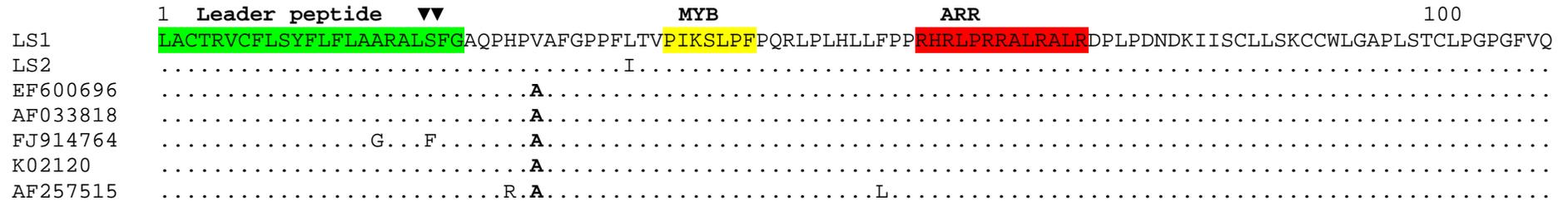
**NES**

LS1 MPKERRSRRRPQPIIRWRQNYFLSFKQVLLVGGPTLYMPARPWFCPMMSPSMPGAPSAGPMSDSNSKGSTPRSPARPTVSTGPPMDDLAASMERCSLDCM  
LS2 .....  
EF600696 ...K.....  
AF033818 .....N.....P.....L.....H.....  
FJ914764 .....T.....P.....P.....S.....  
K02120 .....  
AF257515 .....T.....T.....P.....S.....

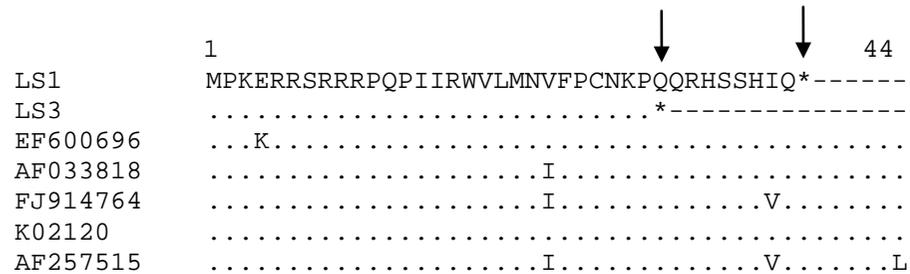
**NLS**

LS1 SPRPAPKGPDDSGSTAPFRPFALSPARFHFPPSSGPPSSPTNANCPRLATVAPLSGTAFFPGETT  
LS2 .....  
EF600696 .....  
AF033818 .....S.....S.....  
FJ914764 .....S.....  
K02120 .....  
AF257515 ...G.....S.....

**(C)G4**



**(D)R3**



**Figura 20. Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas no estructurales de cepas de VLB aisladas de linfosarcoma y otras disponibles.** En la figura se puede observar los alineamientos de aminoácidos correspondientes a: A) tax; B) rex; C) G4 y D) R3. Al igual que en la figura 18, LS1, LS2 y LS3 corresponden a cepas aisladas de linfosarcoma, EF600696 (FLK, línea celular persistentemente infectada); FJ914764 (corresponde a una cepas proveniente de una infección experimental de una oveja con una estirpe Argentina); AF257515 (estirpe Argentina obtenida de PBMC); K02120 (Japonesa, extraída PBMC); AF033818 (USA- Belga , PBMC)

## 5.6 Conclusiones

Los análisis filogenéticos realizados a través de árboles de máxima verosimilitud utilizando genomas completos de VLB, así como también de Deltaretrovirus humanos y simios, revelaron un alto grado de diversificación genética (ver Figura 17). Sin embargo, todas las cepas de VLB analizadas comparten una estrecha relación genética entre sí (Tabla 4 y Figura 17).

A pesar del alto grado de conservación, que presentan las principales regiones estructurales, enzimáticas y regulatorias, entre las cepas de VLB aisladas a partir de diferentes fuentes no tumorales, como ser PBMC, y de linfomas, pueden observarse diferencias entre ellas en las diferentes regiones del genoma. Se cree que el silenciamiento de la expresión viral es fundamental para la progresión tumoral y la proliferación de células tumorales infectadas con VLB (Merimi et al, 2007), así como para el escape al reconocimiento por parte de la respuesta inmune del hospedero (Pierard et al, 2010; Merezak et al., 2001). En ese sentido, la sustitución encontrada en el sitio GRE del 5'-LTR de la cepa de VLB aislada del linfoma, puede contribuir a estos hechos, ya que estudios previos han demostrado que sustituciones en el sitio GRE reducen significativamente la actividad de transcripción basal mediada por LTR (Merezak et al., 2001) (ver Figura 18).

Asimismo, todas las sustituciones de aminoácidos en Tax que fueron previamente relacionadas con la estimulación de la actividad transcripcional de 5'LTR, no fueron encontradas en estos estudios (ver Figura 20-A). Además, una sustitución de Prolina a Serina ( $P \rightarrow S$ ) se observó en la proteína de la nucleocápside (p12-NC) en las cepas de VLB aisladas de linfoma (Fig. 19-A). Los residuos de la NC contactan de forma directa con la señal de empaquetamiento presente en el ARN viral. Consiguientemente, las sustituciones aminoacídicas en la misma región de la NC donde se encontró esta sustitución, afectan el reconocimiento del genoma viral para su encapsidación (Wang et al., 2003).

El dominio N-terminal de glicoproteína de superficie (gp51-SU) juega un papel importante en la infección viral (Portetelle et al., 1989) y esta región puede también contener el dominio de unión al receptor (RBD) de VLB (Johnston et al., 2002). Sustituciones aminoacídicas fueron encontradas en la región del epítipo conformacional de SU en la cepa de VLB aislada de linfoma. Esta región ha sido previamente relacionada con la neutralización (Johnston et al., 2002). Increíblemente, el mismo cambio fue encontrado en el estudio de variabilidad realizado para las estirpes de VLB que circulan en el Uruguay (Ver Figura 9, Cap 4), lo que sugiere una firma en estirpes que circulan en nuestro país y en Brasil.

Estudios anteriores han demostrado que el silenciamiento es un proceso de múltiples pasos que conduce al crecimiento descontrolado de las células B transformadas y la aparición de la enfermedad (Merimi et al., 2007). Las sustituciones que favorecen la supresión de la expresión viral en las células B malignas podría ser una estrategia para eludir el ataque inmune efectivo. Mecanismos genéticos y epigenéticos se han propuesto recientemente para la supresión de la expresión génica de VLB (Colin et al, 2011; Merimi et al, 2007). Los resultados de estos estudios, utilizando secuencias de genomas completos, indican que posiblemente pocas mutaciones o sustituciones pueden ser necesarias o estar implicadas en contribuir al provirus de VLB lograr el silenciamiento mencionado anteriormente.

## **6. Expresión y purificación de la glicoproteína de superficie gp 51**

## 6.1 Resumen

El gen *env* de VLB codifica para un precursor peptídico denominado gp 72, el cual es clivado por acción de la proteasa viral dando lugar a las glicoproteínas gp 30 y gp 51, transmembrana y de superficie respectivamente. La proteína gp 51 presenta un peso de 51 KDa y posee 8 epítopes, 4 lineales y 4 conformacionales. Éstos se relacionan directamente con la actividad biológica del virus como la infectividad e inducción de sincitios. Dicha proteína, además de su utilización para estudios filogenéticos (como se vio en capítulo 4), es fundamental para la detección de anticuerpos contra la misma en el diagnóstico de esta enfermedad. Asimismo, la glicoproteína gp 51 es de gran relevancia biológica ya que es responsable de la infectividad del virus. Por lo que antecede, y dada la gran importancia de esta proteína, en el presente capítulo se trabajó en la obtención de gp 51 mediante el uso de dos sistemas diferentes de expresión. Se llevaron cabo diversas metodologías obteniendo finalmente dicha proteína sin la calidad necesaria para la realización de estudios estructurales y funcionales. La misma fue expresada, purificada y verificada por análisis de espectrometría de masa. Dicha proteína podrá utilizarse para la realización de un método de diagnóstico a nivel nacional, el cual contemple las variaciones antigénicas que presenten las estirpes de VLB circulantes en el Uruguay.

## 6.2 Marco teórico de la investigación

Las glicoproteínas de la envoltura de retrovirus juegan un rol fundamental en el ciclo de replicación de éstos. Generalmente son responsables de la unión a un receptor específico del virus, determinando así el tropismo viral. Están involucradas en el proceso de interferencia viral y muchas de estas glicoproteínas son responsables, además, de la inducción de la formación de sincitios. El gen *env* de VLB se transcribe a partir de ADN proviral y luego es traducido al precursor de la envoltura: Pr 72. Este precursor es procesado generando así una glicoproteína transmembrana (TM): gp 30 y una glicoproteína de superficie (SU): gp 51 (Altaner *et al.*, 1993).

Estas glicoproteínas son antígenos de la envoltura viral. La infección de ganado con VLB, ya sea natural o experimental, induce una respuesta de anticuerpos que usualmente es la única característica constante de la infección durante el período de latencia de la enfermedad. Los anticuerpos están dirigidos principalmente contra la glicoproteína de envoltura gp 51 y la proteína interna del cápside p 24 (Burny *et al.*, 1980). Estos anticuerpos naturales anti-gp 51 producidos por el ganado infectado, evidencian variadas actividades antivirales: neutralizan la infectividad viral y la actividad inductora de sincitios, así como también exhiben un fuerte efecto citolítico en células productoras de VLB.

La glicoproteína gp 51 de VLB es biológicamente muy importante ya que es responsable de la infectividad del virus, y su unión a un receptor celular es el paso inicial de dicha infección. La formación sincitios *in vitro* es resultado de la unión de gp 51 a la membrana de algunas células (Altaner *et al.*, 1993).

Los residuos glicosilados presentes en gp 51 no son sólo dependientes de la especie sino que también podrían variar con el órgano de origen de las células utilizadas para la replicación del virus. Dichas modificaciones contribuyen a la formación de los epítopes conformacionales (Altaner *et al.*, 1993). Por lo tanto, cambios en los patrones de glicosilación podrían influenciar la infectividad del virus tanto positiva como negativamente (Bruck *et al.*, 1983).

Luego de que la poliproteína precursora de las proteínas maduras de envoltura de los retrovirus es clivada proteolíticamente, las subunidades SU y TM se mantienen asociadas entre sí. Inicialmente se reportó que las proteínas SU y TM de VLB estarían unidas por puentes disulfuro (Burny *et al.*, 1978), pero luego se concluyó que no era así dado que TM era perdida durante la purificación de la proteína SU (Burny *et al.*, 1987). Recientemente se ha corroborado que SU y TM están, de hecho, unidas por puentes disulfuro, lo que podría jugar un rol clave en los cambios conformacionales durante la unión al receptor y la iniciación de la fusión (Johnston & Radke, 2000). Si bien el receptor de VLB aún no ha sido identificado, se ha demostrado que los 182 residuos amino-terminales de la glicoproteína de superficie de VLB comprende el dominio de unión al receptor (Lavanya *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, tanto gp 51 como p24, son las proteínas virales inmunodominantes *in vivo* ya que tienen el más alto grado de antigenicidad. Por esta razón, la expresión y purificación de gp 51 de VLB para su uso como un reactivo antigénico representa un abordaje prometedor al desarrollo de ensayos de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra VLB (Merza *et al.*, 1991), así como para el desarrollo de vacunas (De Giuseppe *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 1998).

En el 2004, De Giuseppe y colaboradores utilizando el sistema Baculovirus expresaron el gen que codifica para la glicoproteína principal de la envoltura (gp 51), con su secuencia señal, representada por una secuencia adicional NH<sub>2</sub>-terminal de 33 residuos de aminoácidos de VLB. De este modo fue posible aislar un virus recombinante que expresara una proteína gp51 secretada en células de insecto.

La proteína gp 51 recombinante expresada se caracterizó utilizando anticuerpos monoclonales anti-VLB mediante análisis de Western blot y ELISA. Ésta fue entonces utilizada como antígeno únicamente, ya que no presentó la calidad suficiente para realizar ensayos estructurales y funcionales, y se desarrolló un ELISA con gp 51 recombinante (rgp 51) para la detección de anticuerpos VLB.

Es por lo que antecede que el diseño de la expresión de gp 51 es clave y representa un desafío interesante para poder estudiar la estructura y funcionalidad de tan importante proteína viral. Por otro lado, la elección de la línea celular productora de virus podría ser importante al considerar la producción de la glicoproteína para vacunas dada la importancia de los residuos de glicosilación de esta proteína. Asimismo, no existe en la actualidad estructura alguna de una glicoproteína de superficie de un *Deltaretrovirus*.

### 6.3 Objetivo

El objetivo de este capítulo es contribuir al conocimiento de la biología del Virus de la Leucosis Bovina mediante la expresión y purificación de la glicoproteína de superficie gp 51.

Para alcanzar este objetivo nos basamos en los siguientes puntos de trabajo, los cuales se detallan a continuación:

- 1- Expresión en células de mamífero, en particular en células de mieloma murino X-63 mediante transfección estable de un plásmido conteniendo el gen de gp 51-SU bajo control del promotor de Ig.
- 2- Expresión y purificación en *E. coli* de la proteína recombinante gp 51 mediante la utilización de un vector de expresión inducible.

## 6.4 Materiales y Métodos

### 6.4.1 Expresión de la proteína gp 51 de VLB en células de mamífero

#### 6.4.1.1 Construcción pSV2k-gp 51

Utilizando los productos de amplificación obtenidos correspondientes al gen *env* gp 51 en estudios previos (ver capítulo 4) se realizó la adaptación de los mismos mediante el empleo de oligos específicos con los sitios de restricción *Cla* y *Not* I para la posterior clonación en el vector pSV2k (ver Fig. 21).

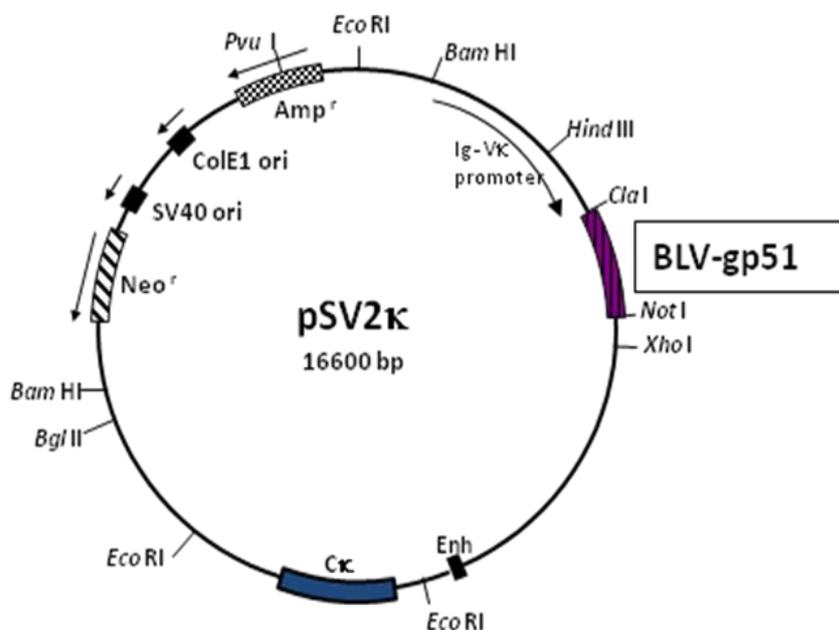


Figura 21. Construcción de pSV2k-gp 51. Esquema representativo de la construcción realizada

#### 6.4.1.2 Mantenimiento de la línea celular murina X63

La línea de células de mamífero a utilizar fueron linfocitos B murinos derivados de mieloma denominada X63. La misma es una línea que presenta crecimiento en suspensión y se mantuvo bajo el siguiente medio de cultivo: RPMI, 4 mM de L-glutamina 20 % a 10 % de suero bovino fetal (SBF). Posteriormente se realizó la electroporación de estas células con la construcción pSV2k-gp 51.

#### **6.4.1.3 Electroporación de células murinas X63 y clonación por dilución límite**

Se agregó 3 µg de ADN linealizado de la construcción pSV2k-gp51 a una cubeta de electroporación BTX de 0,4 mm, para luego adicionar 800 µl de células a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml.

Posteriormente se incubó en hielo por 20 min y se configuró el electroporador de la siguiente forma: 500V de capacitancia y resistencia, tiempo de capacitancia = 1000, tiempo de resistencia = 24, voltaje: 300 V y longitud de pulso de 7 mili segundos. Luego de este paso se transfirieron las células de forma inmediata al medio de crecimiento pre-calentado y se ubicaron en una placa de 24 pocillos para luego dividir las en una dilución correspondiente a 1 célula cada tres pocillos en placas de 96. Todos estos pasos fueron realizados aumentando la concentración de forma gradual del antibiótico Neomicina, de forma de no estresar a las células de forma inmediata, y poder obtener los clones viables dados por la resistencia conferida por el vector incorporado. La selección de los clones fue realizada mediante observación bajo microscopio invertido de las placas durante varios días.

#### **6.4.1.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en una cuba electroforética Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell de acuerdo al protocolo de Laemmli (1970), utilizando un gel de corrida al 10% y un gel concentrador al 4,5%. Las electroforesis se llevaron a cabo amperaje constante de 25 mA hasta que las muestras atravesaran el gel concentrador, para luego aumentarse a 30 mA.

#### **6.4.1.5 Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue**

Los geles se tiñeron en una solución de 0,2% de Coomassie Brilliant Blue en 45% de metanol y 10% de ácido acético durante una hora. Para decolorar, se dejaron durante toda la noche en una solución de 45% de metanol y 10% de ácido acético.

#### **6.4.1.6 Western Blot**

Luego de correr los geles de poliacrilamida, estos fueron transferidos a membranas de PVDF (Macherey-Nagel, Germany). Las muestras se electro-transferieron en un ECL-semi dry Blatter (Amersham) por 1 hr. Luego se bloqueó la membrana con 20 ml de Buffer de bloqueo a 4 °C. Luego de tres lavados con buffer de lavado se incubó con el primer anticuerpo monoclonal, a una dilución 1:1000. Posteriormente se procedió a lavar la membrana en 5 oportunidades durante 5 minutos cada una con buffer de lavado y se colocó el segundo anticuerpo conjugado con biotina, que es anti IgG de ratón y fue nuevamente incubado con la membrana.

### **6.4.2 Expresión y purificación de la proteína gp 51 de VLB en *E. coli***

#### **6.4.2.1 Construcción pET21 d-gp51**

Utilizando los amplicones obtenidos correspondientes al gen *env* gp 51 en estudios previos (ver capítulo 4) se realizó la adaptación de los mismos mediante el empleo de oligos específicos con los sitios de restricción Nhe I y Xho I para la posterior clonación en el vector pET21 d (ver Fig. 22).

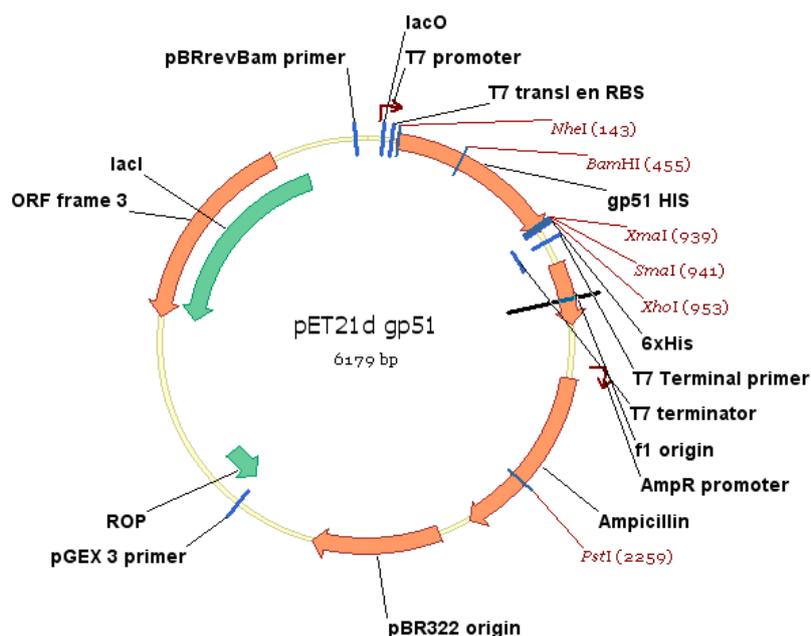


Figura 22. Construcción pET21 d-gp51. Esquema representativo de la construcción pET21 d-gp51.

#### 6.4.2.2 Expresión de gp 51 recombinante

La expresión de las proteínas recombinantes se realizó en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLys usando el vector de expresión inducible pET21d (Novagen), el cual provee una etiqueta de polihistidina (6XHIS). Asimismo, la expresión fue inducida en medio LB y a 30 °C por el agregado de 1 mM IPTG durante 5 hrs.

#### 6.4.2.3 Purificación de gp 51

La purificación de la proteína fue realizada mediante el siguiente protocolo el cual se basó en una cromatografía de afinidad a metales ( $\text{Ni}^{2+}$ ), IMAC, en condiciones desnaturizantes.

A partir de 0,5 litros de cultivo de células se realizó el lavado y ruptura de cuerpos de inclusión de las mismas. En una primera instancia se centrifugó dicho cultivo a 5.000 g y una temperatura de 4 °C para la obtención del pellet celular. Posteriormente, se llevó el mismo a un volumen de 15 ml en el buffer de resuspensión (20 mM Tris HCl

pH: 8,0) y adicionó lysozima, coctel de proteasas sin EDTA, y se dejó reposar 30 min en hielo.

Se procedió a la sonicación de dicho pellet, resuspendido en el buffer mencionado anteriormente, en sucesivas etapas, cada una de ellas tuvo una duración de 25 seg y una amplitud de 20-30%. Luego se centrifugó a 20.000 rpm a 4 °C por 30 min a 1 hr y se removió el sobrenadante, para más adelante suspender el pellet en 10 ml de buffer de aislamiento (2M Urea, 20mMTris HCl, 0,5 M NaCl, 2% triton-X 100 pH 8).

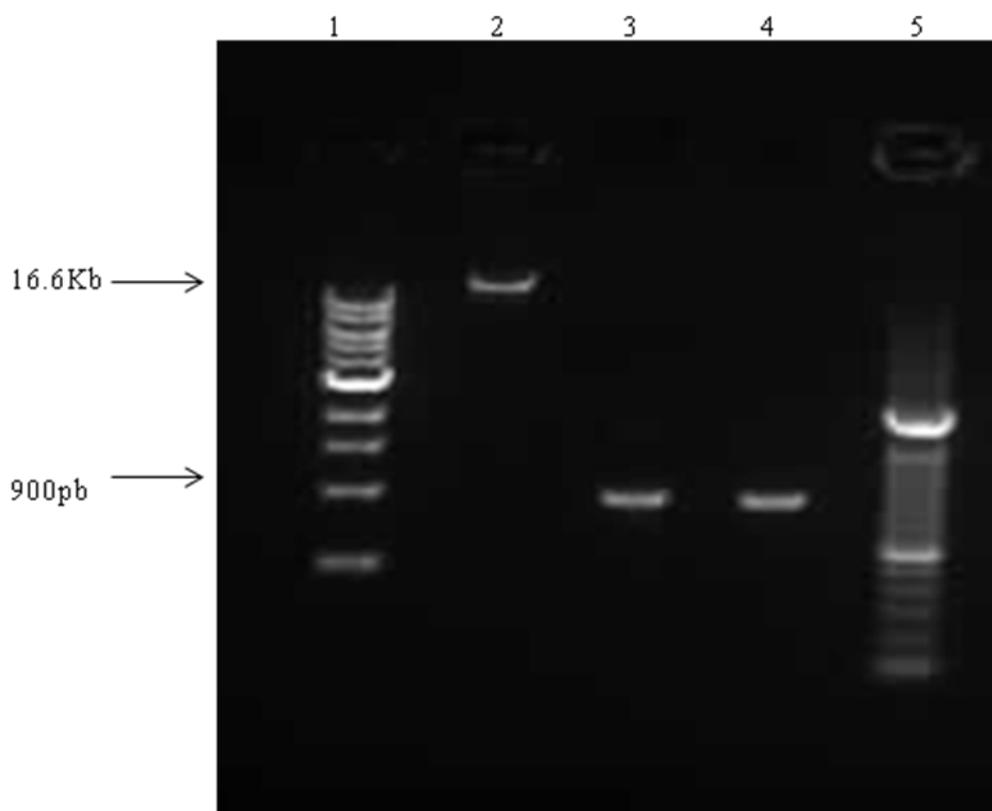
A continuación se volvieron a realizar los mismos pasos de sonicación, para luego, una vez más, resuspender el pellet, pero en esta ocasión en 5-10 ml de binding buffer (6M Guanidinio, 20mMTris HCl, 0,5 M NaCl, 5mM Imidiazol, 1 mM 2-mercaptoentanol, pH8). Se dejó reposar 1 hr a temperatura ambiente y se centrifugó a 20.000 rpm a 4 °C por 15 minutos. Finalmente el sobrenadante fue filtrado y pasado la columna. De esta forma, se recuperaron fracciones sin haber lavado la columna, y luego lavándola.

## 6.5 Resultados

### 6.5.1 Expresión de la proteína gp 51 de VLB en células de mamífero

#### 6.5.1.1 Purificación y preparación de inserto gp 51 y vector pSV2k

Como puede observarse en la figura 23 el vector pSV2k (16.600 pb), así como el inserto correspondiente a la amplificación del gen completo para la proteína gp 51 (900 pb) fueron purificados de forma óptima, y verificados a través de la corrida de un gel de agarosa para su posterior clonación.

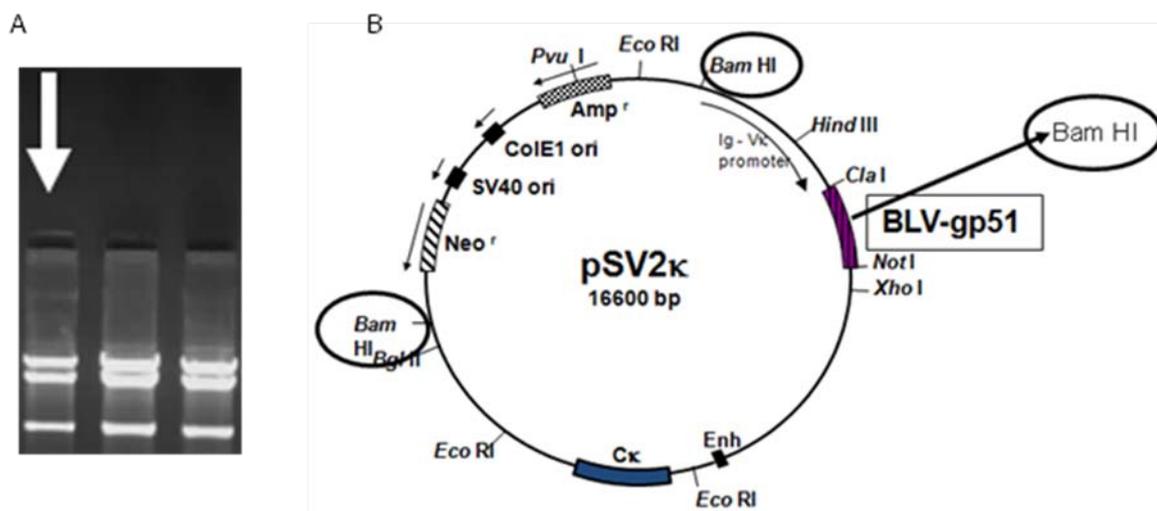


**Figura 23. Visualización por electroforesis en gel de agarosa de inserto y vector purificados.** Se puede observar un gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa peso molecular de 1 Kb, carril 2 vector Psv2K de 16.600 pb previamente digerido, carril 3 y 4 purificados de los amplificaciones del gen completo de gp 51 correspondiente a 900 pb y en el carril 5 peso molecular de 100 pb.

### 6.5.1.2 Clonación de gp 51 en pSV2k

La clonación del inserto gp 51 en pSV2k fue realizada con éxito y verificada mediante el corte con la enzima de restricción Bam HI, la cual digirió en tres regiones la construcción pSV2k-gp 51 (ver Figura 24).

Dos de los cortes fueron provocados sobre la secuencia del vector, generando 2 fragmentos de 8 y 6 kb aproximadamente, y uno sobre la secuencia del inserto generando un fragmento de menor tamaño de aproximadamente 2,6 kb (ver Figura 24).

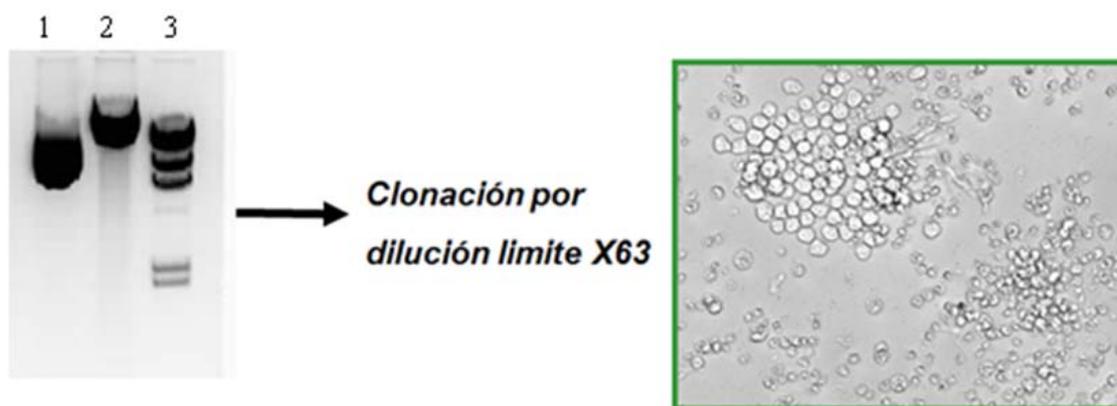


**Figura 24.** Verificación de la construcción pSV2k-gp 51. En A, se observa un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio con el patrón de bandas obtenidas por la digestión con Bam HI de la construcción pSV2k-gp 51. En B, se muestra un esquema representativo de la construcción pSV2k-gp 51 y los sitios de corte para la enzima Bam HI.

### 6.5.1.3 Clonación por dilución límite de células X63

La clonación por dilución límite de células X63 transfectadas con la construcción pSV2k-gp 51 fue realizada satisfactoriamente. El objetivo de este trabajo fue la obtención de varios clones derivados de una única célula, los cuales presenten de forma estable la construcción denominada anteriormente. Como puede verse en la

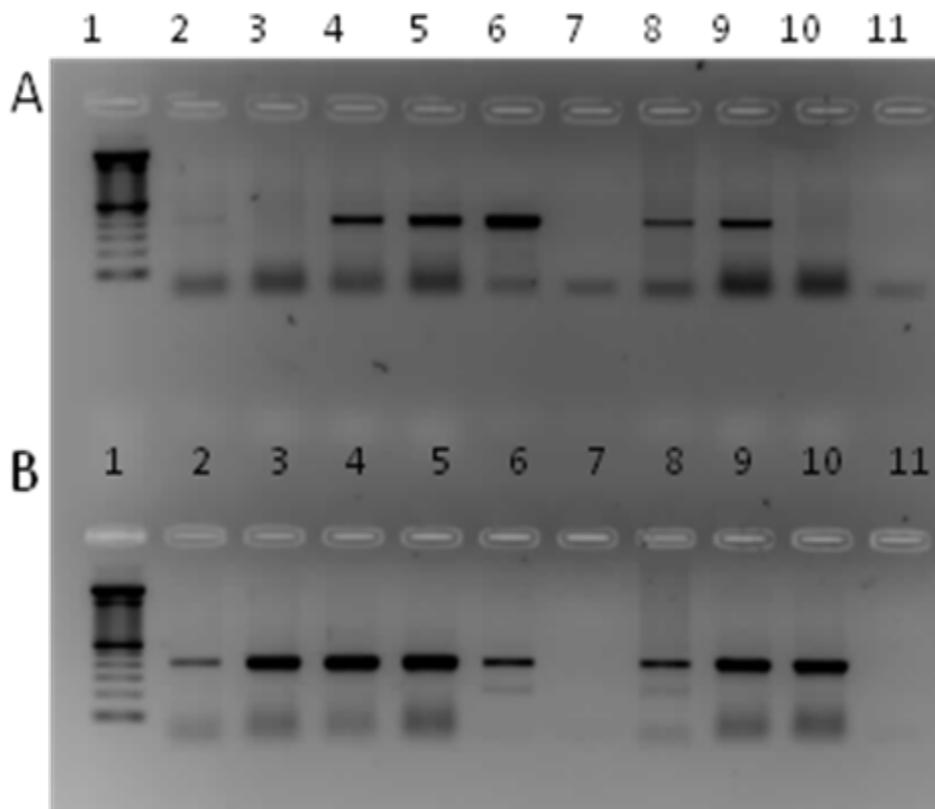
figura 25, pSV2k-gp 51 fue linealizado con el objetivo de electroporarlo en esta forma y el mismo pudiera integrarse dando lugar a transfectantes estables que expresen de forma constitutiva, bajo el promotor kappa de inmunoglobulinas, el producto del gen *env gp 51*.



**Figura 25.** Linealización de pSV2k-gp 51 y clonación por dilución limite en X63. En la figura se puede observar un gel agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se carril el pS-gp 51ck sin linealizar, en el carril 2 la construcción linealizada y en el carril 3 se observa el marcador  $\lambda$  hind III.

#### 6.5.1.4 Verificación de clones positivos

La única verificación positiva de los clones obtenidos fue mediante la detección de ARN mensajero de la proteína gp 51 mediante la realización de una transcripción reversa específica para la síntesis de ADNc a partir de mensajeros (mediante uso de oligo dT). Por otro lado, tanto por ensayos de WB, así como también por citometría de flujo de los clones cultivados, no fue posible detectar la proteína. La búsqueda de la misma fue realizada de forma intracelular y extracelular. Como mencionamos anteriormente, en el caso de la extracción de ARN de los clones y posterior realización de ADNc mediante el empleo de oligos polyT, fue posible amplificar del mismo un segmento codificante para dicha proteína. Estos resultados son mostrados en la figura 26.

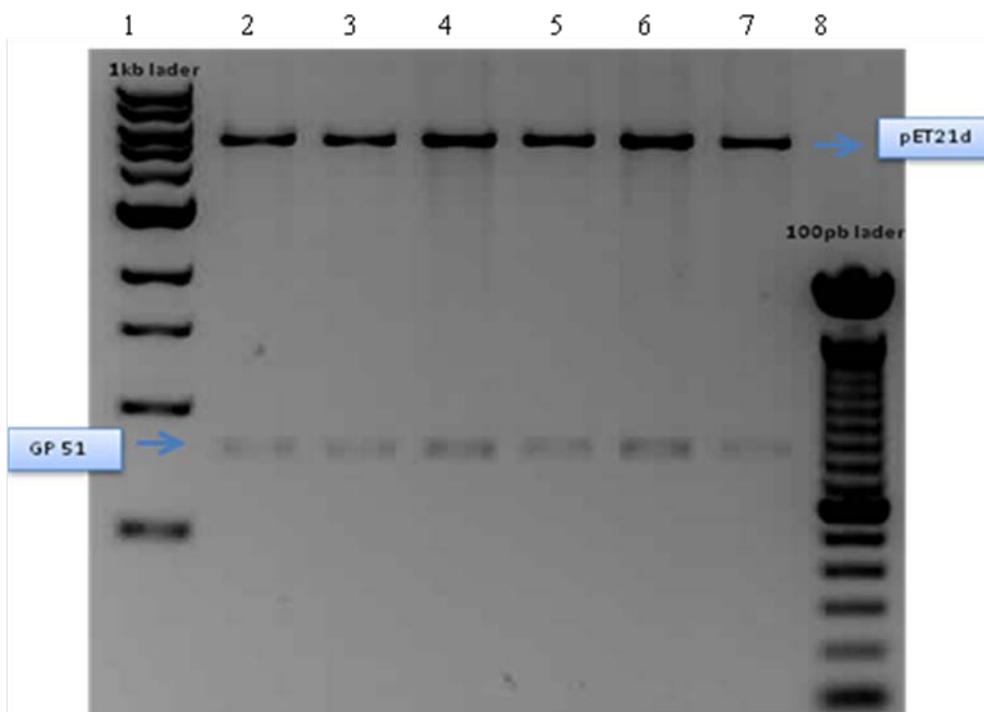


**Figura 26. Verificación de clones positivos de X63 por RT-PCR- Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio**  
 En la parte A y B del gel se observa un fragmento inferior correspondiente al amplificado del mensajero de gp 51, y un fragmento de mayor peso molecular correspondiente al mensajero de GAPDH el cual se realizó como control de extracción de ARN de los clones.

## 6.5.2 Expresión y purificación de la proteína gp 51 de VLB en *E. coli*

### 6.5.2.1 Clonación de gp 51 en pET21 d

Con el objetivo de poder obtener la proteína gp 51 en el sistema de expresión de *E. coli*, se procedió a la realización de la construcción pET21 d-gp51, como puede verse en la figura 22. Para ello fue necesaria la verificación de la construcción mediante un análisis de digestión utilizando las mismas enzimas de restricción Not I y Cla I, tal como se detalló en materiales y métodos de este capítulo. La clonación se corroboró mediante la digestión del inserto (ver Fig. 26).

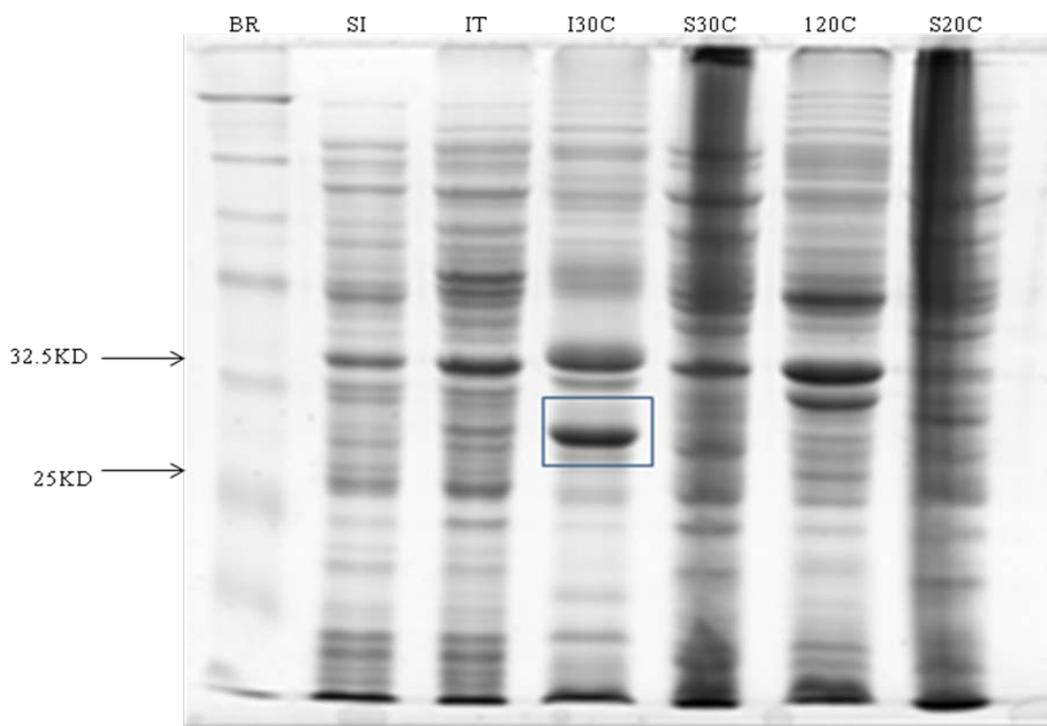


**Figura 27. Verificación de la construcción pET21 d-gp51 por digestión con Not I y Cla I.** Puede observarse en el carril 1 un marcador de peso molecular de 1Kb, carril 2 al 7 digestión de la construcción pET21d-gp 51, en cada carril se encuentra la banda correspondiente al vector pET21d aproximadamente 6.000 pb y una banda a 900 pb correspondiente al inserto gp 51. En el carril 8 se observa un marcador de paso molecular de 100 pb.

Se pueden apreciar claramente los tamaños correspondientes al inserto gp 51 de 900 pb y al vector de aproximadamente 6000 pb.

#### 6.5.2.2 Optimización de condiciones de expresión de gp 51 en BL21 (DE3)pLysS

Con el objetivo de poder obtener la proteína gp 51 se trabajó con el sistema de expresión de *E. coli*, concretamente se ensayaron diversas condiciones sobre la cepa BL21 (DE3) pLysS, de modo de optimizar la expresión así como la cantidad de proteína obtenida. De esta forma se evaluaron: temperatura de crecimiento, concentración de inductor, tiempo y temperatura de inducción y velocidad de agitación. Finalmente las condiciones óptimas encontradas para la expresión de dicha proteína fue de crecimiento a 30 °C durante 5 hrs mediante la inducción de 1 mM de IPTG a 200 rpm (ver figura 28).



**Figura 28. Ensayo de condiciones de expresión.** Gel SDS Page al 15 %; en el carril BR marcador de peso molecular Broad Range, en el carril SI: Soluble Inducido, en el carril IT: Inducido Total, en el carril I30C: Insoluble Inducido a 30C 5 hrs y en el carril S30C: Soluble Inducido a 30 C 5 hrs; en el carril I20C: Insoluble inducido 20 C toda la noche; en el carril S20C soluble 20C toda la noche

La expresión de gp 51 puede apreciarse de forma clara bajo las condiciones anteriormente descritas en la fracción insoluble a 30 °C, la banda correspondiente se encuentra seleccionada con un recuadro (ver Fig. 28). Posteriormente la banda seleccionada fue recortada y enviada para su análisis por espectrometría de masa por MALDI-TOF. Estos resultados fueron confirmatorios por mapeo peptídico y pueden observarse en la figura 29.

## Identificación de gp 51 recombinante por mapeo peptídico mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)

4700 Reflector Spec #1 MC⇒BC⇒NF0.7[BP = 1272.7, 63220]

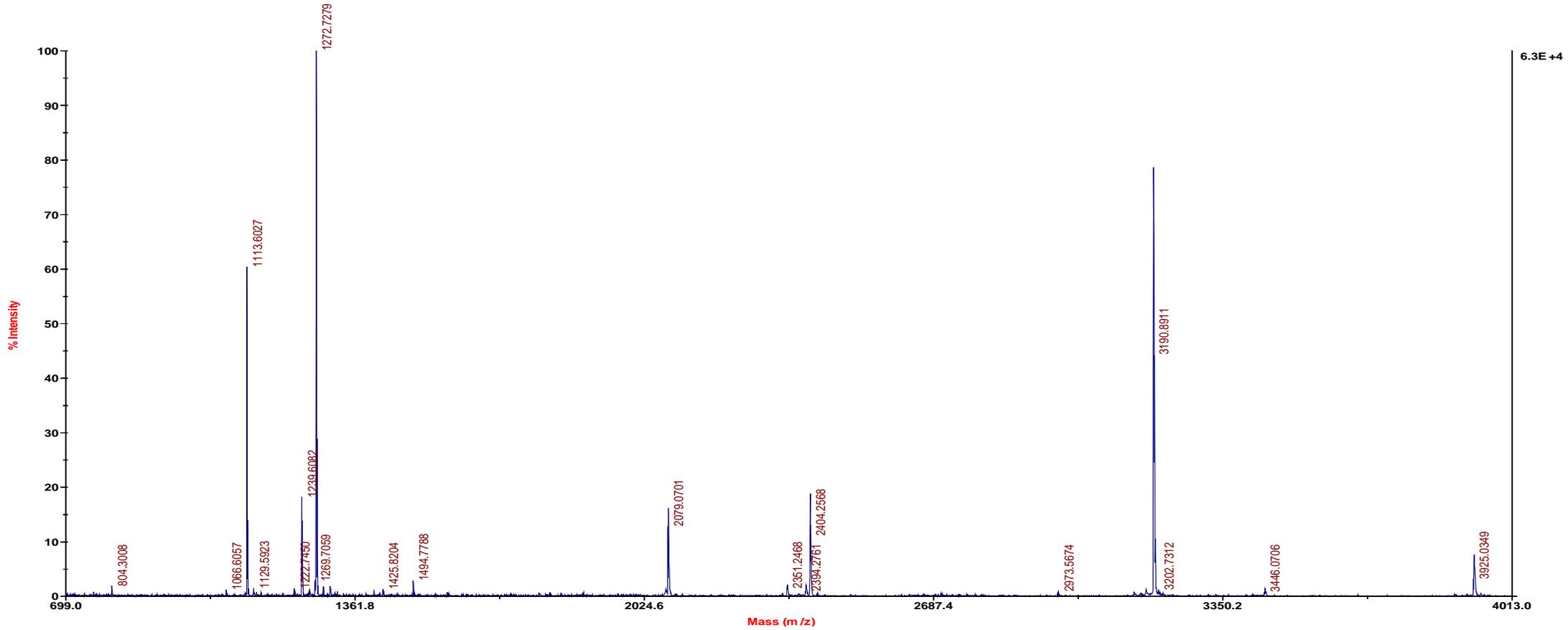


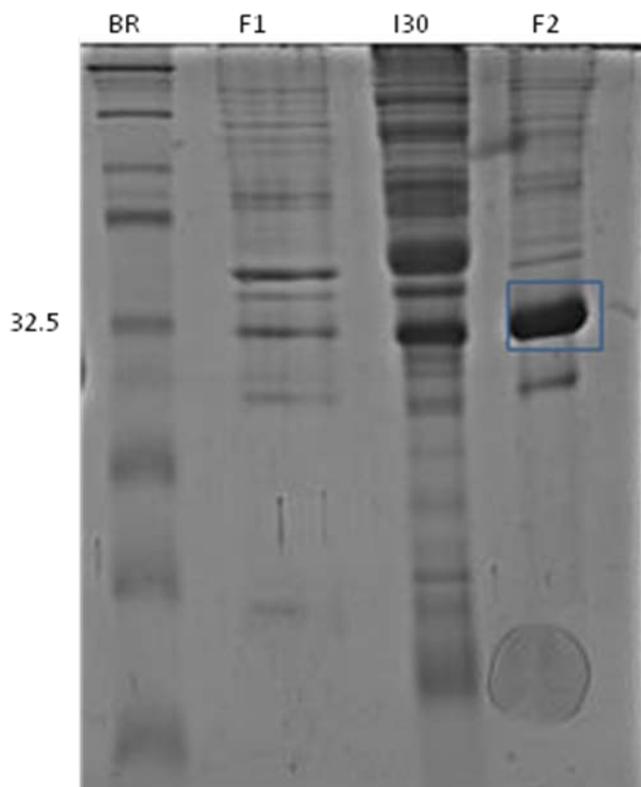
Figura 29. Identificación de gp 51 recombinante por mapeo peptídico mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Espectro obtenido en ensayo de MALDI-TOF: Con la búsqueda realizada en base de datos pública se identifica de manera estadísticamente significativa a la proteína gp 51 del Virus de la Leucosis Bovina.

### 6.5.2.3 Purificación por IMAC de gp 51 recombinante obtenida de cuerpos de inclusión

Como puede verse en la figura 30, la fracción 2 de la elución de la columna de IMAC fue en la que se obtuvo la proteína gp 51. La misma puede compararse con la fracción I30 en la cual se observa la banda de interés previa a la purificación, dicha forma de sembrar se utilizó a modo de control para la correcta purificación de la proteína.

Asimismo, la fracción 1 presentó una concentración de 5,7 mg/ml y permanece soluble (ya que el buffer de elución fue un buffer fosfato 0,5 M imidazole). La fracción 2 precipita totalmente, por lo que se centrifugó y resuspendió en urea 8 M. Al cuantificarse se observa una concentración de 2,5 mg/ml.



**Figura 30. Purificación de proteínas gp 51 por IMAC.** En la figura se puede observar un gel SDS page al 15% teñido con comassie blue. En el carril BR se observa un marcador de peso molecular de Brad Range, en el carril F1 se observa Fracción número 1 obtenida de la columna, en el carril I30 el Inducido total a 30C y en el carril F2 la Fracción número 2 obtenida de la elución de la columna, el rectángulo seleccionado muestra la purificación de la proteína gp 51.

## 6.6 Discusión

En una primera instancia se intentó la expresión por ingeniería genética de la glicoproteína viral de superficie gp 51-SU, la cual ha sido demostrado que presenta una alta inmunogenicidad. Es de importancia destacar el componente glucídico de esta glicoproteína, el cual resulta fundamental tanto en la estructura como en la inmunogenicidad de la misma. Fue por esta razón que se eligió un sistema de expresión eucariota, en otras palabras, que posea la maquinaria bioquímica necesaria capaz de glicosilar esta proteína. Asimismo, se escogió como sistema a una célula homologa a la cual infecta el VLB naturalmente, un linfocito B, en este caso murino. Además, se tuvo en cuenta la elección del promotor que debería controlar al vector de expresión, otra vez diseñando el experimento por homología a la expresión natural de esta proteína en el transcurso de una infección viral, fue así que se utilizó un promotor de inmunoglobulinas, kappa.

Asimismo, este sistema fue diseñado para secretar las glicoproteínas recombinantes hacia el medio extracelular lo cual permitiría a partir del sobrenadante de cultivo, optimizar los protocolos de purificación. Desafortunadamente no pudo detectarse la proteína en estudio luego de vastas pruebas, las cuales incluyeron desde el escalado de cultivo para mayor obtención de sobrenadante y por lo tanto de proteína, hasta ensayos de WB y citometría de flujo contra dicha proteína. Sorpresivamente, si pudimos detectar niveles de expresión de mensajero para esta proteína, confirmando de esta manera que los hibridomas resultantes de este experimento transcribían ARNm de gp 51.

Diferentes hipótesis puede plantearse para explicar la falta de esta proteína o no detección de la misma. Una posibilidad es que estos mensajeros son degradados previamente a ser traducidos, esto podría explicarse por el reclutamiento de los mismos por parte de estructuras como los cuerpos de procesamiento, denominados más comúnmente como P-Bodies.

Los cuerpos de procesamiento se encuentran en distintas regiones del citoplasma de las células eucariotas y consisten en estructuras donde intervienen las cuales regulan negativamente la expresión de muchos ARNm. Estos cuerpos de procesamiento se han observado en las células somáticas procedentes de vertebrados e invertebrados, incluyendo las plantas y levaduras. Hasta la fecha, se ha demostrado que desempeñan un papel fundamental en degradación y decaimiento de la concentración de ARNm en general (Bregues et al., 2005). Es importante tener en cuenta que no todos los ARNm que entran a cuerpos de procesamiento no son degradados, ya que se ha demostrado que algunos pueden salir de estas estructuras y volver a iniciar la traducción (Bregues et al., 2005; Bhattacharyya et al., 2006).

Otra alternativa es que la proteína pudo haber sido tóxica para las células y mediante otros mecanismos, como ser la vía de la ubiquitina, fue degradada, ya que los clones crecieron con normalidad bajo la resistencia a neomicina conferida por la construcción. Finalmente, existe la posibilidad que la misma se haya expresado pero en niveles significativamente basales e indetectables para las técnicas que utilizamos. De ser así, igualmente representaría una gran dificultad, la cual posiblemente no podríamos resolver, para la purificación y posterior realización de diversos ensayos funcionales y estructurales que teníamos previsto realizar con dicha proteína.

Con respecto a la expresión en *E. coli*, la misma fue realizada de modo de obtener la secuencia peptídica de la proteína gp 51, ya que de forma previa, dada la inviabilidad de este sistema para glicosilar residuos claves que naturalmente presenta, buscamos obtener los epítopes lineales de mayor importancia desde el punto de vista antigénico de la proteína.

Durante la puesta a punto de la expresión se evaluaron diferentes condiciones de las cuales pudo obtenerse un protocolo optimizado para la expresión y purificación de la proteína gp 51 en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Dicha proteína fue obtenida relativamente pura, previa purificación por IMAC, en una fracción de elución de lavado de la columna. La misma, requirió de su re-solubilización en urea 8 M, dado que fue obtenida en la fracción insoluble mediante previa ruptura de cuerpos de inclusión.

De este modo generamos en el laboratorio una importante herramienta para el diseño de un método de detección, como ser ELISA o dot blot, contra sueros de vacas naturalmente infectadas con VLB. Actualmente, existe una línea de investigación en el laboratorio la cual presenta un perfil biotecnológico que podrá hacer uso de esta herramienta, como ser la expresión de la proteína gp 51 de las estirpes que circulan naturalmente e infectan a nuestro ganado, en el sistema optimizado en este trabajo. Asimismo, como se detalló en el capítulo 4, existen variantes a nivel nacional de este virus que presentan importantes mutaciones en epítopes lineales de neutralización del virus de la proteína gp 51, las mismas podrán ser expresadas y utilizadas en diferentes ensayos para la elaboración de un kit diagnóstico a nivel a nacional que contemple estas variantes.

## **7. Diseño de librerías moleculares para el estudio de la dinámica de cuasiespecies de virus ARN**

## 7.1 Resumen

Los virus cuyos genomas están constituidos por ARN presentan tasas de mutación muy elevadas. Las tasas de error concebidas por las ARN polimerasa dependiente de ARN (APdA), presentes en estos virus, se estiman entre  $10^{-3}$  y  $10^{-6}$ . Por consiguiente, una población de un virus ARN no se compone de una sola variante genética, sino de un conjunto de variantes virales estrechamente relacionadas desde un punto de vista genético, denominadas cuasiespecies. Hasta el momento no se ha diseñado un método para poder medir de forma precisa la frecuencia de mutaciones de una cuasiespecie viral dada. Las nuevas metodologías de secuenciación profunda tienen la sensibilidad adecuada para hacer frente a tan importante desafío. Sin embargo, estos métodos presentan una importante tasa de error, la cual puede enmascarar la verdadera frecuencia de mutaciones que tienen lugar durante la replicación viral y dinámica de cuasiespecies virales concebida por la misma. Es por lo que antecede, que se fijó como objetivo de este trabajo, el diseño un nuevo y prometedor método para el análisis de cuasiespecies. Éste se basó en la realización de librerías moleculares circulares que puedan reducir el error de lectura de secuencia y dar a conocer de forma precisa la verdadera dimensión y frecuencia de mutaciones de una cuasiespecie viral. Para realizar este nuevo método se trabajó con el Virus Polio en laboratorio del Dr. Raúl Andino de la Universidad de California de San Francisco.

## 7.2 Marco teórico de la investigación

Los virus cuyos genomas están constituidos por ARN presentan tasas de mutación muy elevadas. Las tasas de error concebidas por las ARN polimerasa dependiente de ARN (APdA), presentes en estos virus, se estiman entre  $10^{-3}$  y  $10^{-6}$  por nucleótido copiado, mientras que las tasas que presentan las ADN polimerasas se estiman en el orden de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$  (Vignuzzi et al., 2005). Por consiguiente, una población de un virus ARN no se compone de una sola variante genética, sino de un conjunto de variantes virales estrechamente relacionadas desde un punto de vista genético, denominadas cuasiespecies.

Las altísimas tasas de mutación y el gran tamaño de las poblaciones de cuasiespecies virales permiten a los virus ARN evolucionar y adaptarse a cambios y desafíos durante la infección viral (Biebricher, C.K. and M. Eigen., 2006). Por consiguiente, es la población viral en su conjunto y no una estirpe viral de forma individual el blanco de la selección. Más aún, estudios recientes demuestran que las cuasiespecies virales no son solo un conjunto de mutantes, sino una población de variantes que interactúan entre sí, contribuyendo a las características de la población viral y siendo una entidad absolutamente dinámica. Por consiguiente, comprender los mecanismos moleculares que subyacen en la dinámica, interacción y evolución de cuasiespecies de virus ARN es de fundamental importancia para el diseño de nuevas y efectivas estrategias antivirales.

Estudios recientes realizados en el laboratorio del Dr. Raúl Andino en la Universidad de California, San Francisco, han permitido aislar una variante de virus Polio (PV) que se replica en altos niveles en células HeLa, generando una menor diversidad genética y produciendo una población de cuasiespecies limitada en cuanto a las mutaciones adquiridas en la misma. Este fenómeno es debido a un único cambio aminoácido (G64S) en la APdA. Por consiguiente, esta variante es incapaz de adaptarse a condiciones adversas de crecimiento y se encuentra muy atenuada *in vivo*, no pudiendo producir el efecto citopático que caracteriza al virus Polio (PV).

Sin embargo, el fenotipo atenuado de esta variante puede ser devuelto a su estado salvaje mediante la ampliación de la cuasiespecie a través del tratamiento de la misma con un agente mutagénico como la ribavirina (Domingo, 2006). Asimismo, el equilibrio dinámico entre capacidad de adaptación y carga mutacional es de fundamental importancia para la supervivencia y evolución de las poblaciones de virus ARN.

Por lo que antecede, es evidente que tanto la diversidad genética como la estructura poblacional de la cuasiespecie desempeñan un rol de fundamental importancia en el fitness viral, o capacidad replicativa de un virus en un ambiente dado.

Una medida de la patogénesis viral es la infectividad específica (proporción de partículas virales que son infectivas). Las poblaciones de virus ARN se caracterizan por una baja infectividad específica: la tasa de unidades formadoras de placas (PFUs) al total de partículas virales se ha estimado en el orden de 0,001 para PV (Racaniello et al., 2007). Una pregunta importante a responder es por qué sólo una fracción de los viriones es infecciosa. Una posible hipótesis es que la baja infectividad puede deberse o ser parcialmente explicada por la presencia de genomas no infectivos presentes en la cuasiespecie viral. La teoría de cuasiespecies predice que al aumentar la diversidad de una población, una mayor proporción de esta podrá atravesar el umbral de error (Biebricher, C.K. y M. Eigen., 2005). Así, cuasiespecies muy diversas deberían tener una mayor fracción de genomas no infecciosos y por tanto una menor infectividad específica.

Por lo que antecede, y la gran importancia de poder entender a la dinámica de las cuasiespecies virales, es que nos preguntamos:

¿Cómo podemos medir cuantitativamente la diversidad viral?

Un desafío técnico importante para hacer frente a esta pregunta es cómo caracterizar el espacio de secuencias de una población viral. Una meta importante es desarrollar métodos rápidos y cuantitativos para determinar la distribución de mutantes en una cuasiespecie dada, con alto grado de resolución temporal, ya que la misma, como mencionamos anteriormente, es una entidad dinámica. La secuenciación ultra

profunda tiene la sensibilidad y la naturaleza cuantitativa necesaria para realizar investigaciones sobre la deriva genética viral, la selección natural y la respuesta a estrategias antivirales.

### 7.3 Objetivo

El objetivo de este capítulo es contribuir al conocimiento de la dinámica de cuasiespecies virales de virus cuyos genomas están constituidos por ARN, utilizando a PV como modelo. Para ello se procederá al diseño de librerías moleculares específicas para el análisis y abordaje por secuenciado profundo de este fenómeno.

Para alcanzar este objetivo nos basamos en los siguientes puntos de trabajo, los cuales se detallan a continuación:

- 1- Generación de ARN genómico de PV transcripto *in vitro*, e infección y titulación de PV en células Hela S2.
- 2- Obtención de partículas virales y extracción de genomas de PV para realización de librerías circulares para el análisis de la dinámica de cuasiespecies virales.
- 3-Optimización y diseño de este nuevo método para el estudio de la evolución de cuasiespecies virales por secuenciado profundo.

## 7.4 Materiales y métodos

### 7.4.1 Transformación de células *E. coli* con el plásmido PV -1

La transformación de la cepa *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-Blue con el plásmido PV-1, el cual contiene toda la secuencia codificante para el genoma de PV tipo 1 (ver Fig. 31) se realizó utilizando el método de shock térmico, tal como se detalló en el capítulo 4, sección materiales y métodos (Licursi et al., 2002).

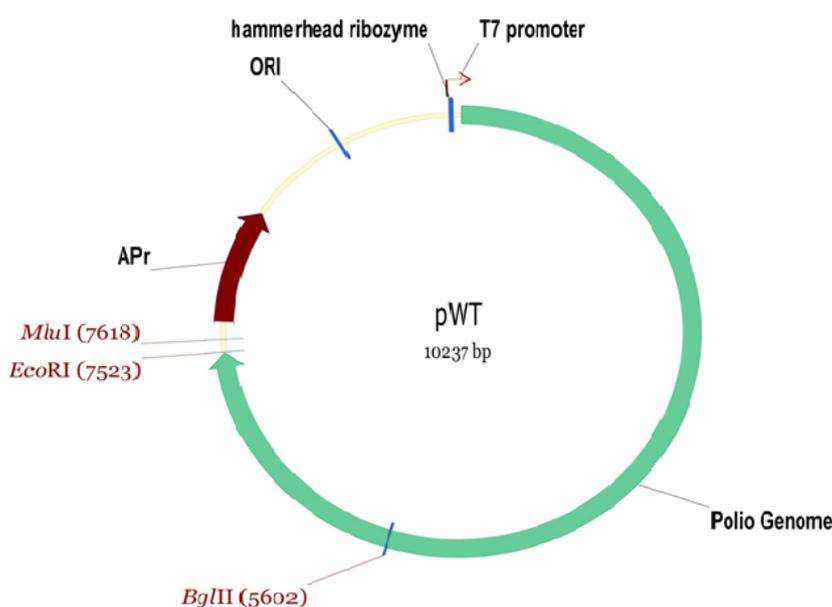


Figura 31. Mapa del plásmido utilizado para la transcripción *in vitro* de todo el genoma de PV.

### 7.4.2 Extracción del ADN plasmídico por Lisis Alcalina

La extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas se realizó por lisis alcalina tal como se detalló en el capítulo 4 (sección materiales y métodos).

### 7.4.3 Linealización del ADN plasmídico

Para transcribir *in vitro* el genoma de PV primero fue necesario realizar de forma previa la linealización del plásmido mediante el corte con EcoRI, ya que el mismo presenta un único sitio de corte para esta enzima. Para reacción se utilizaron 10 µg de

ADN plasmídico y 30 U de enzima, durante una incubación por 1 hora a 37 °C en su buffer de reacción.

#### **7.4.4 Purificación del ADN lineal correspondiente al genoma de PV**

Se agregó 3M de acetato de sodio pH 5,2 al ADN para llevar al mismo a una concentración de 0,3M, para luego adicionar 1 volumen de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico. Posteriormente se mezcló bien y centrifugó por 2 minutos a 12.000 g. Luego, se removió la fase acuosa (la capa superior) y precipitó con 2,5 volúmenes de etanol 100%, dejando reposar la reacción por 20 min a temperatura ambiente. El paso siguiente fue la centrifugación a máxima velocidad durante 30 min para más adelante poder lavar el pellet con 2 volúmenes de etanol 70%. Finalmente se centrifugó por 5 min a máxima velocidad y dejó secar el pellet para luego resuspender el mismo en un volumen apropiado de agua libre de nucleasas.

#### **7.4.5 Transcripción *In vitro* ADN lineal correspondiente al genoma de PV**

La reacción de de transcripción *in vitro* fue realizada mediante la siguiente reacción: 20 µl de buffer de transcripción *in vitro* 5X, 30 µl dNTPs 25 mM, 20 µg de ADN linearizado, 2 µl ARN Polimerasa T7, 1 µl ARNasa out y finalmente se completo hasta 100 µl de H<sub>2</sub>O. Posteriormente se dejó incubar la reacción durante toda la noche a 37 °C.

#### **7.4.6 Electroporación de células HeLa S3 con ARN de PV transcripto *In vitro***

Se tripsinizó aproximadamente 2 T-150 en 100 % de confluencia, y se agregó al menos un volumen de D-PBS, para posteriormente centrifugar por 5 min a 1.000 rpm. Luego las células fueron lavadas dos veces nuevamente con D-PBS. El paso siguiente, fue la acondicionamiento de las células en un volumen de D-PBS para ajustar su concentración 5 x 10<sup>6</sup> células/ml. Posteriormente se adicionaron 20 µg de ARN transcripto *in vitro* a una cubeta de electroporación BTX de 0,4 mm y se agregaron 800

μl de células a cada cubeta. Luego de dejar reposar 20 minutos en hielo se electroporó utilizando el siguiente seteo:

- 500V de capacitancia y resistencia
- Tiempo de capacitancia = 1000
- Tiempo de resistencia = 24
- Voltaje: 300 V

Finalmente se transfirieron las células de forma inmediata a medio de crecimiento precalentado en una T-75 e incubó a 37 °C.

#### **7.4.7 Ensayo de plaqueo viral para Poliovirus en células HeLa S3**

Para la titulación de PV se realizó el siguiente ensayo de plaqueo viral. Se sembraron placas de 6 pocillos a una densidad de  $6-9 \times 10^6$  células/placa un día antes del ensayo de plaqueo viral. El día del ensayo de plaqueo viral, se colocó el baño de agua a 57 °C. Luego, se fundió el volumen apropiado de agarosa al 2% en agua (aproximadamente 8-12 ml por placa). Posteriormente, se calentó medio libre de suero (o PBS) y DMEM 2X a 37 °C (el DMEM 2X fue preparado a partir de su forma en polvo + 2,4g de bicarbonato de sodio y luego filtrado y esterilizado previo a su uso).

A continuación se realizaron diluciones seriadas del virus en medio libre de suero, para ello se utilizó tubos de 5 ml y se vortexeó entre cada dilución. Se realizaron las siguientes series de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ . A continuación se lavó cada pocillo con PBS o medio libre de suero, luego se removió el medio de lavado y agregó 0,25 ml de cada dilución a su correspondiente pocillo. Consiguientemente, se incubó las placas a 37 °C por 30 min (agitando las mismas cada 10 min). Inmediatamente antes de su uso, se mezcló la agarosa 2% y DMEM 2X 1:1 y cubrió cada pocillo con 2-4 ml de dicha mezcla, para posteriormente dejar las placas alcanzar la temperatura ambiente y luego incubarlas a 37 °C.

Luego de 48 horas, se agregó formaldehído 2% a cada pocillo y luego incubó a temperatura ambiente por 10-15 min. Removió el recubrimiento de agarosa y adicionó

crystal violeta a cada pocillo. Luego de 10-15 min se lavaron las placas con hipoclorito e inmediatamente se también fueron lavadas con H<sub>2</sub>O.

#### **7.4.8 Purificación de viriones de PV por colchón de sacarosa**

Se creció 2,5-3,0 L de células HeLa S3 en frascos de cultivo celular con agitación, luego fueron centrifugadas y se peletearon las células (1.000 rpm por 5 min) utilizando tubos cónicos de 500 ml. Las mismas fueron resuspendidas en medio libre de suero y se agregó 1,25-3,00 x 10<sup>10</sup> PFU de PV (MOI aprox. 10). El volumen final fue de 25-30 ml en un tubo cónico de 50 ml y se incubó a 37 °C por 30-45 min, mezclando periódicamente. Posteriormente, se transfirió a un matraz de agitación más pequeño y ajustó el volumen a 250-300 ml para incubar durante 37 °C por 8-24 hrs.

De forma siguiente fue transferido a tubos cónicos, congelados-descongelados 3 veces, de modo de romper todas las células, y se clarificó (3.500 rpm por 5 minutos) y transfirió a tubos cónicos nuevos.

#### **7.4.9 Ultracentrifugación**

Para llevar a cabo la ultracentrifugación se descongeló el sobrenadante de cultivo viral y transfirió a 5 tubos de UC (Beckman 344058). El 6to tubo se utilizó como blanco (con agua o buffer). Se procedió a una primera etapa de centrifugación de 10 min a 14K en rotor SW28. Luego, se transfirió el sobrenadante de cultivo viral a tubos cónicos de 50 ml y agregaron 40 µl de ARNasa A a 10 µg/ml por 1 hr a temperatura ambiente. Durante el tratamiento con ARNasa, se prepararon los 6 tubos de UC con 6 ml de un colchón de sacarosa 30% en HBSS, mientras que se ajustó el sobrenadante de cultivo viral a 0,5% de SDS y EDTA 2 mM. Posteriormente se pipeteó suavemente el sobrenadante en la sacarosa, con el propósito de no mezclar ambos.

Posteriormente se centrifugó 4 hrs a 28.000 rpm en el rotor SW28 (a una temperatura de 15 °C). A continuación, se aspiró el sobrenadante dejando el colchón de sacarosa en su lugar y lavó la parte superior de la sacarosa con 1 ml de HBSS. Finalmente se

removió la sacarosa con una p1000 y tomó el pellet de viriones, el cual fue resuspendido en buffer de lisis de viriones.

Posteriormente a la purificación de viriones de PV, se procedió la estrategia diseñada para la generación de librerías circulares como puede observarse en la figura 32 y se detalla posteriormente.

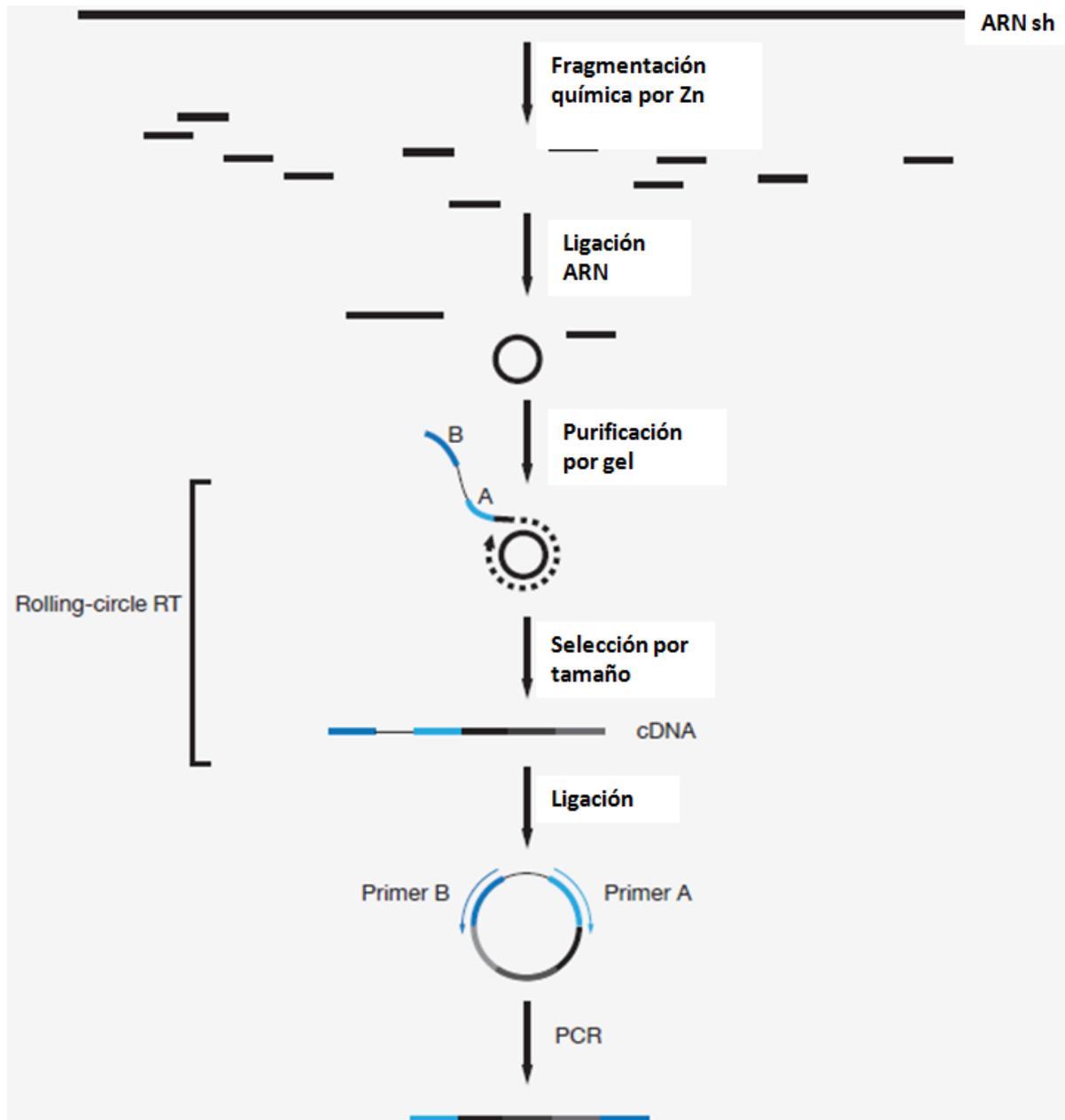


Figura 32. Esquema representativo del diseño experimental para la generación de librerías circulares para el análisis por secuenciado profundo de cuasiespecies virales.

#### **7.4.10 Extracción y fragmentación de genomas de PV**

La extracción de ARN genómico de PV fue realizada mediante la utilización del Kit comercial QIAgen, según las instrucciones de su fabricante. Para proceder con la fragmentación de ARN se llevó el volumen de la muestra de ARN a 9 µl con agua libre de nucleasas. Luego se agregó 1 µl de Buffer de Fragmentación 10X, el cual consta de cationes de Zn los cuales clivan, bajo la acción de alta temperatura, de forma aleatoria al ARN, generando una mezcla de fragmentos de ARN de diferentes tamaños. Esta mezcla se vortexó, se centrifugó brevemente y se incubó a 70 °C por 15 min. Finalmente se agregó 1 µl de Solución Stop (acción quelante) y se almacenó a -80 °C.

#### **7.4.11 Purificación de ARN de Urea-PAGE**

Luego de la realización de un gel de poliacrilamida 15% suplementado con urea 6M, y corrido las muestras de ARN correspondientes, se tiñó el gel por 10-40 min con SYBR Gold 1:10000 en TBE 1X. Se visualizó el gel en un transiluminador UV para luego cortar las bandas deseadas. Utilizando una aguja de 0,7 mm se realizó un orificio en el fondo de tubos de 0,5 ml y se ubicaron las bandas, ubicándose luego los tubos de 0,5 ml en uno de 1,5 ml. Luego de una centrifugación a máxima velocidad por 3 minutos, se suspendió el gel en 300 µl de agua libre de nucleasas y se incubó por 10 min a 70 °C. Posteriormente se cargó la suspensión en una columna Spin-X (acetato de celulosa) y se centrifugó por 3 min a máxima velocidad, para finalmente recoger el eluido que se precipitó con etanol.

#### **7.4.12 Análisis por Bioanalyzer de fragmentos de ARN purificados**

El Bioanalyzer Agilent 2100 está diseñado para determinar la calidad del ARN y la cantidad de una forma más fiable y rigurosa que los sistemas tradicionales. El mismo fue utilizado para el análisis de los fragmentos de ARN genómicos de PV purificados luego de la fragmentación. El equipo consiste en un sistema de microelectroforesis

mediante el uso de nanocapilares. Es por ello, que este sistema minimiza la cantidad de ARN que se usa para este control, además del tiempo empleado en ello. Permite obtener un algoritmo denominado RIN (Número de Integridad de ARN) que permite determinar la calidad de las muestras de ARN total en base a un rango numérico del 1 al 10, siendo 1 el valor para una muestra de ARN totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta.

#### **7.4.13 Fosforilación y reparación de extremos por Polinucleotido quinasa (PNK)**

Se diluyó una concentración 10 pmol de cada uno de los fragmentos de ARN purificados en un volumen total de 20  $\mu$ l en agua libre de ARNasas, para luego desnaturalizar los mismos durante 3 min a 95 °C. Posteriormente se incubó en hielo por 2 min y se agregaron 2,5  $\mu$ l de buffer 10X de T4 ARN ligasa. A continuación se adicionaron 2,5  $\mu$ l de PNK (10 U/ $\mu$ l) y se mezcló bien. Finalmente se incubó por 1 hr a 37 °C.

#### **7.4.14 Circularización de ARN**

Para la circularización de ARN se agregaron 20  $\mu$ l de agua libre de ARNasas a los fragmentos de ARN tratados con PNK. Éstos se desnaturalizaron incubándolos a 95 °C por 3 min y se llevaron luego a hielo por 2 min. Posteriormente se agregaron 2,5  $\mu$ l de buffer 10X de T4 ARN ligasa (NEB), 0,5  $\mu$ l de ATP 10mM, 2  $\mu$ l de T4 ligasa (20 U/ $\mu$ l) y se vortexeó la mezcla. A continuación se incubó la mezcla por 1 hr a 37 °C y se procedió con el protocolo de purificación de ácidos nucleicos por fenol cloroformo, tal como fue detallado previamente para ADN en el punto 7.4.4.

El pellet de ARN fue resuspendido en 10  $\mu$ l de buffer de desnaturalización 1X y se corrió a 260V en un gel de poliacrilamida 15% suplementado con urea 6M, con un control no ligado. El pellet se resuspendió en 11  $\mu$ l de agua libre de ARNasas y se

analizó 1 µl del ARN circular utilizando el Bioanalyzer con un chip de para análisis de ARN pequeño.

#### **7.4.15 Transcripción Reversa utilizando ARN circular como molde y ligación del ADNc**

Se realizó una Transcripción Reversa (RT) para obtener ADNc, a partir de los fragmentos de ARN circulares purificados obtenidos previamente. Para ello realizamos una mezcla de reacción utilizando los siguientes reactivos por cada muestra: 3 µl de agua Milli-Q, 1 µl de dNTPs a una concentración de 10 mM, 3 µl de hexámeros aleatorios unidos a los oligos de Illumina separados por un linker y 3 µl de cada molde circular de ARN. Esta mezcla se incubó a 65 °C por 5 min y posteriormente se incubó en hielo 1 min. A continuación se adicionaron a la mezcla 4 µl de buffer 5X, 2 µl de DTT 100 mM, 1µl de ARNasa out y 1µl de la enzima RT (ADN polimerasa ARN dependiente superscript II) de Invitrogen, en una concentración de 200 U/µl, obteniendo un volumen final de 20 µl. Esta mezcla de reacción fue incubada 10 min a 25 °C, 50 min a 42 °C y 15 min a 70 °C en el termociclador Corbett PalmCycler CG-196.

#### **7.4.16 PCR para la generación de librerías para análisis por secuenciado profundo utilizando Illumina.**

Se realizó la PCR utilizando la secuencias específicas de los oligos de Illumina contenidos en el ADNc obtenido. Para la misma se procedió utilizando los siguientes cebadores:

directo, 5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACTCTTTCCCTACACGACGC TCTCCGATCT- 3', y reverso, 5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGCTCT TCCGATCT- 3'. La mezcla de reacción final contenía Tris HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 200 µM, cada cebador a 200 nM, y 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen, EE.UU). Las condiciones para la amplificación por PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 seg, hibridación a 55 °C durante

30 seg, y extensión a 72 °C durante 30 seg; seguido por una extensión final a 72 °C durante 10 min.

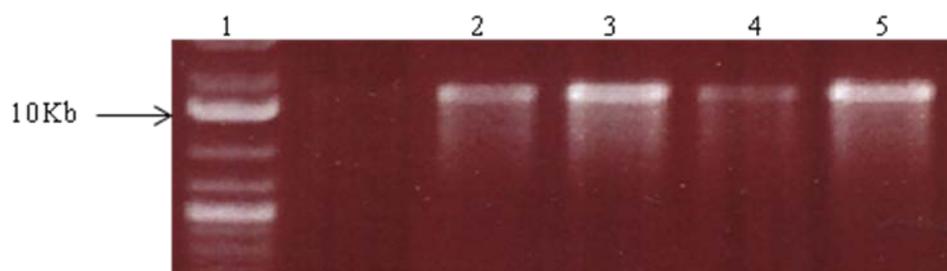
#### **7.4.17 Secuenciación convencional para verificación de la librería**

La secuenciación de los productos de PCR fue realizada en el Servicio de Secuenciación de Genetch Hall, UCSF, utilizando los oligos de Illumina mediante el kit *Big Dye DNA sequencing kit* (Perkin-Elmer) en un secuenciador 373 DNA Sequencer (Perkin-Elmer).

## 7.5 Resultados

### 7.5.1 Purificación de viriones y genomas de PV

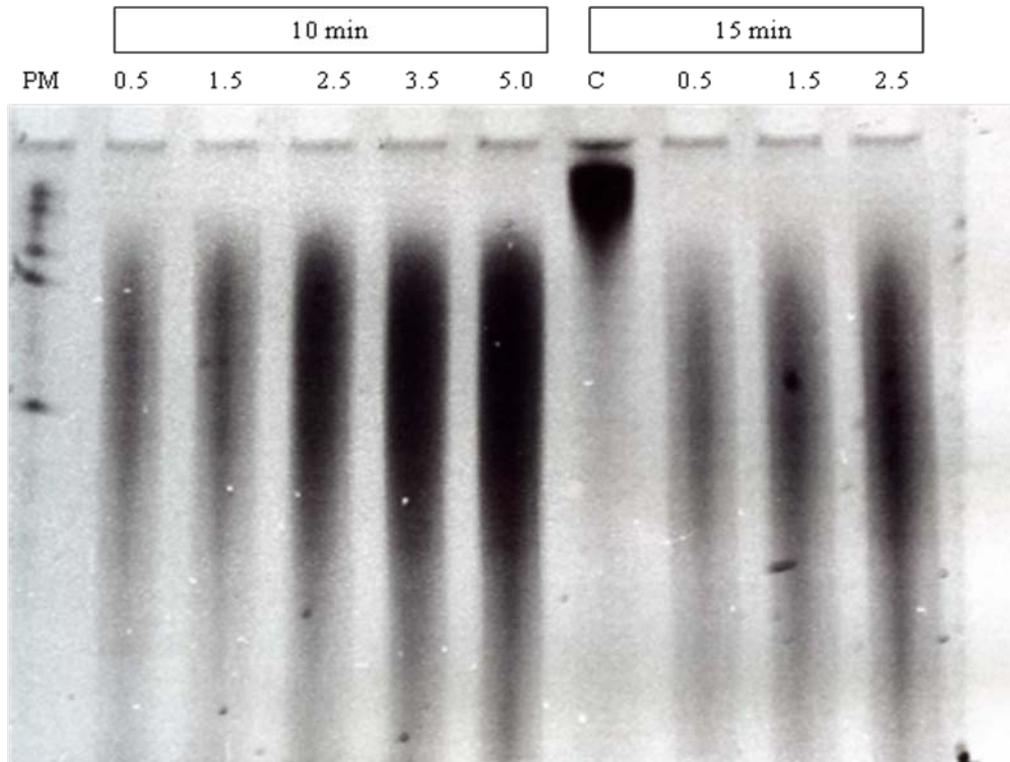
La purificación de los viriones de PV fue realizada con éxito. Posteriormente, mediante la utilización de los mismos, fue llevada a cabo la extracción y purificación de genomas virales (ver figura 33).



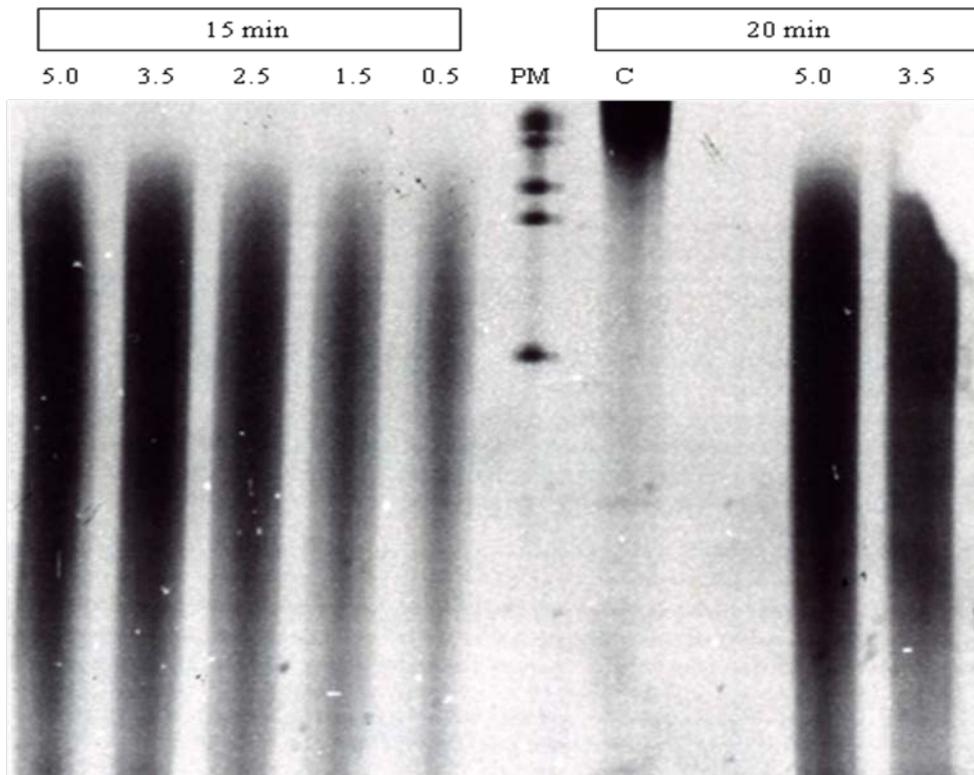
**Figura 33. Extracción de genomas de PV a partir de los viriones purificados.** En la figura se observa un gel de agarosa al 1 % teñido con BrEt. En el carril 1 marcador de peso molecular de ARN, en los carriles 2 al 5 se observan diferentes genomas de PV extraídos a partir de los viriones previamente purificados.

### 7.5.2 Fragmentación de genomas de PV mediante la acción de cationes de Zn.

Para la fragmentación de los genomas de PV se utilizó un protocolo basado en la acción de los cationes de Zn sobre los ácidos nucleicos, tal como se detalló en el punto 7.4.10. Para la puesta a punto del mismo fue necesaria la realización de diversas pruebas, que consistieron en la variación de los tiempos de incubación a 70 °C del ARN con Zn, y de la cantidad de ARN en  $\mu\text{g}$  a fragmentar. Estos ensayos se encuentran descritos en las figuras 34 y 35. De esta manera la optimización de la fragmentación utilizando cationes de Zn fue puesta a punto de forma exitosa. El paso de fragmentación puede verse en el mapa de diseño general del experimento (ver figura 32).

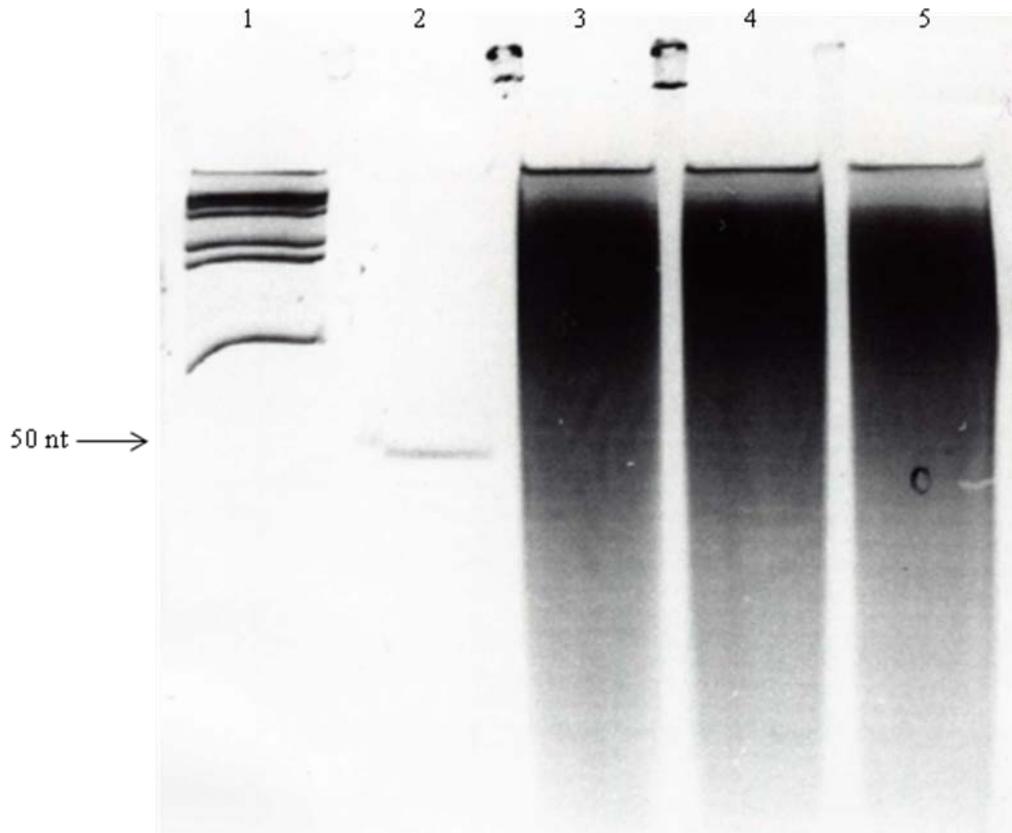


**Figura 34. Visualización de la corrida electroforética de los genomas de PV previamente fragmentados con Zn.** En la figura se observa un gel desnaturalizante de acrilamida al 15 % - urea 6M. En los carriles se observa un PM, marcador de peso molecular de ARN, en los cinco carriles siguientes se observa claramente la corrida de ARN de diferentes concentraciones, desde 0.5  $\mu\text{g}$  a 5.0  $\mu\text{g}$  que fueron tratados con Zn durante 10 minutos. El carril C corresponde a un genoma de ARN sin fragmentar. Los últimos tres carriles corresponden a las corridas de ARN de concentración 0.5 a 2.5  $\mu\text{g}$  tratados con Zn durante 15 minutos. Se observa un aumento gradual de la cantidad de ARN de menor tamaño al aumentar el tiempo de exposición al Zn a 70  $^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 35. Visualización de la corrida electroforética de los genomas de PV previamente fragmentados con Zn.** En la figura se observa un gel desnaturizante de acrilamida al 15 % - urea 6M. En los cinco primeros carriles se observa la corrida de ARN de diferentes concentraciones, desde 5.0  $\mu\text{g}$  a 0.5  $\mu\text{g}$  que fueron tratados con Zn durante 15 minutos. En PM, marcador de peso molecular de ARN. El carril C corresponde a un genoma de ARN sin fragmentar. Los últimos dos carriles corresponden a las corridas de ARN de concentración 5.0 y 3.5  $\mu\text{g}$  tratados con Zn durante 20 minutos. Se observa un aumento gradual de la cantidad de ARN de menor tamaño al aumentar el tiempo de exposición al Zn a 70 °C.

Posteriormente a la optimización de la fragmentación de ARN genómico de PV, fue necesaria la realización de geles con carriles de mayor tamaño para poder sembrar un mayor volumen de ARN genómico fragmentado, y así proceder al corte y purificación de bandas de tamaños comprendidos entre 30 y 100 nucleótidos, como puede verse en la figura 36.

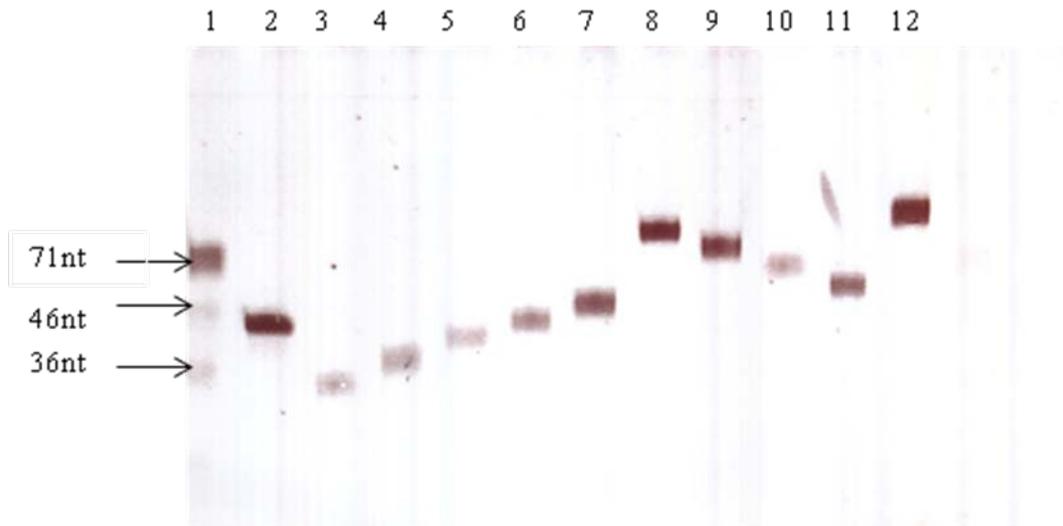


**Figura 36. Visualización de la corrida electroforética de los genomas de PV previamente fragmentados con Zn.** En la figura se observa un gel desnaturante de acrilamida al 15 % - urea 6M. En el carril 1 se observa un marcador de paso molecular de ARN. En el carril 2 un marcador solo de 50 nts de ARN y en los carriles 3, 4 y 5 genomas de PV fragmentados para su posterior purificación en diferentes tamaños

### **7.5.3 Purificación de fragmentos de ARN de tamaño específico a partir de geles Urea-PAGE**

Posteriormente a la fragmentación se llevó a cabo la purificación de fragmentos de ARN del genoma de PV de diferentes tamaños. Los mismos oscilaron en un rango de 30 a 100 nts. Fue necesaria la utilización de un marcador de ARN de 50 nts, además del de peso molecular para la correcta identificación de los fragmentos de interés. La purificación fue realizada con éxito, tal como se puede observar en la figura 37.

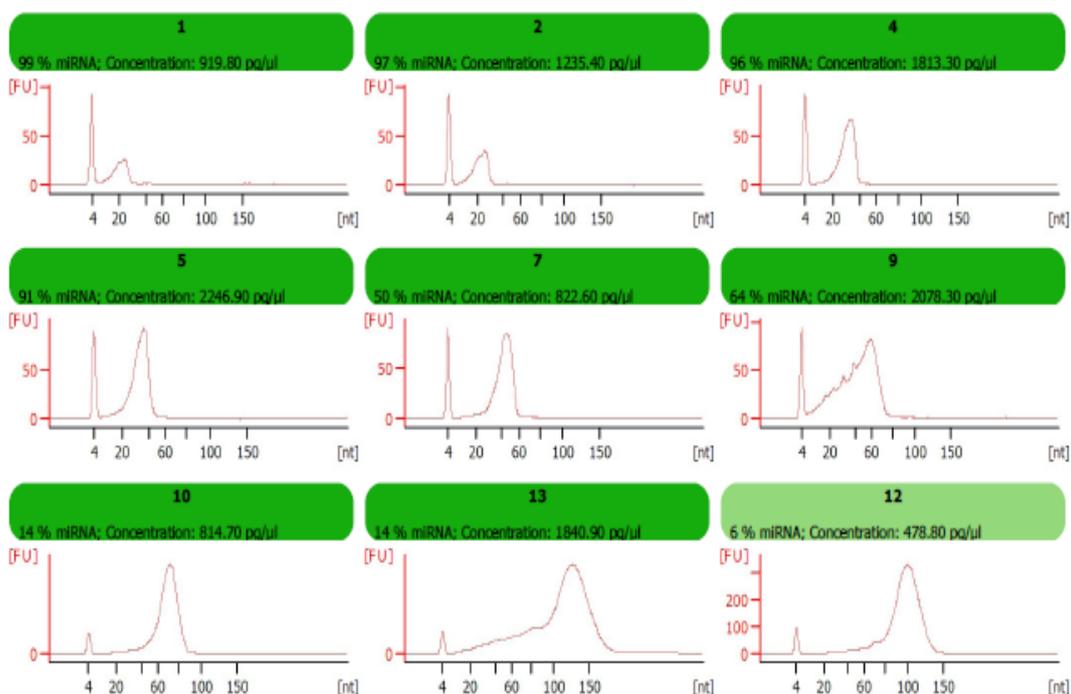
Asimismo pudo corroborarse una mejor fragmentación en tamaños iguales o superiores a los 50 nts.



**Figura 37. Purificación y electroforesis de fragmentos de ARN genómicos de PV para ligación.** En la figura se observa un gel de acrilamida desnaturizante al 15 % -urea 6M. Los fragmentos fueron ligados utilizando T4 ARN Ligasa. En el carril 1 se observa un marcador de ARN, en el carril 2 un cincuentamero de ARN y en los carriles 3 al 12 se observan los diferentes fragmentos de ARN purificados que habían sido previamente cortados del gel de ARN de PV fragmentado.

#### 7.5.4 Análisis de los fragmentos de ARN purificados

Para analizar de forma precisa la integridad y tamaños de los fragmentos de ARN purificados se utilizó el equipo Bioanalyzer, el cual está diseñado para determinar la calidad del ARN y la cantidad de una forma más fiable y rigurosa que los sistemas tradicionales. Los análisis realizados pueden verse en la figura 38.



**Figura 38. Resultados del Bioanalyzer de fragmentos de ARN purificados.** El número de cada una de los gráficos se corresponde con el número de la muestra analizada. En el eje Y se graficó fluorescencia de la medida, en el eje X el tamaños en nucleótidos de la muestra de ARN corrida.

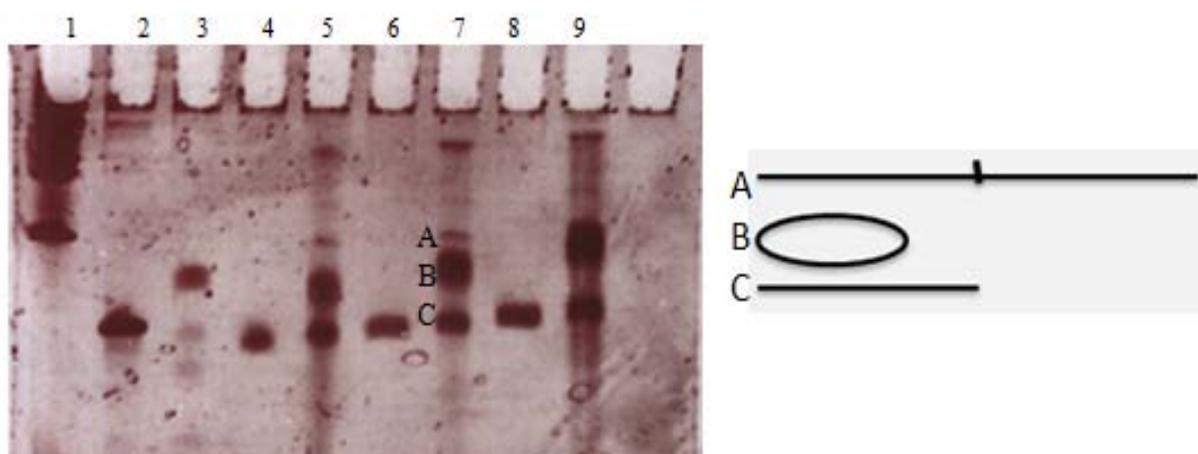
### 7.5.5 Fosforilación y reparación de extremos por Polinucleótido quinasa (PNK)

La fragmentación química del ARN por iones de Zn deja como resultado la desfosforilación de los extremos 5'. El uso de la enzima PNK resuelve este problema mediante la fosforilación de los extremos 5' y la adición de grupos OH en 3', en presencia de ATP. Este ensayo es necesario para la posterior ligación de los fragmentos mediante la acción de la T4 ARN ligasa.

### 7.5.6 Circularización de fragmentos de ARN

Para la obtención de los moldes circulares de ARN cada población de fragmentos de ARN purificada fue tratada con la enzima T4 ARN ligasa. Durante la reacción de ligación, se obtuvieron distintas formas moleculares. Por un lado, varios fragmentos se

ligaron entre sí dando lugar a formas lineales de tamaños mayores. A su vez, también se encontramos un importante porcentaje de ARN que permaneció sin ligarse. Por último, aproximadamente entre el 20 y 30% de la población específica de fragmentos sometidos a la reacción se ligaron en sí mismos dando lugar a las formas circulares esperadas. Todos estos resultados son detallados en la Figura 39. La migración diferencial, obtenida bajo las condiciones desnaturizantes del gel fue clave para poder purificar solo aquellos fragmentos circulares y ligados en sí mismos. De este modo se obtuvieron los moldes circulares para poder realizar las reacciones de RT rodante o “Rolling RT” de forma posterior.



**Figura 39. Ligación de fragmentos genómicos de PV.** En la figura se observa un gel de acrilamida desnaturizante al 15 %- urea 6M. En el carril 1 marcador de peso molecular de ARN; en el carril 2 un cincuentamero de ARN; en el carril 3 marcador de peso molecular “in house”; en el carril 4 un fragmento de 35 nt sin ligar; en el carril 5 se observa la ligación de un fragmento de 35 nt; en el carril 6 se observa un fragmento de 50 nt sin ligar; en el carril 7 ligación de un fragmento de 50nt; en el carril 8 fragmento de 60 nt sin ligar; y en el carril 9 se observa la ligación de un fragmento de 60 nt.

### 7.5.7 Secuenciación convencional para verificación de la librería

Como se aprecia en la figura 40, se pudo correr y purificar la librería realizada por PCR y efectivamente pudo corroborarse que la lectura de la secuencia estaba repetida en tándem. En este caso, el número de repeticiones de la secuencia a amplificar fue de 3 veces.



## 7.6 Discusión

Hasta el momento no se ha podido calcular la frecuencia de mutaciones de una cuasiespecie viral de forma precisa. Las metodologías que existen en la actualidad para secuenciar una entidad tan dinámica y compleja no permiten abordar este objetivo.

Esta afirmación puede explicarse de la siguiente forma, nuestros métodos actuales para evaluar la frecuencia de mutaciones de una cuasiepecies viral producen datos estadísticamente cuestionables, o sin la robustez suficiente. Asimismo, el bajo número de nucleótidos que son capaces de secuenciar los métodos convencionales representa un impedimento para analizar y cubrir la totalidad del espectro de variantes virales en una cuasiepcie dada de un virus cuyo genoma está constituido por ARN.

Sin embargo, las nuevas tecnologías de secuenciación desafían este importante obstáculo pudiendo generar una enorme cantidad de información de secuencias, en el orden de millones de éstas, las cuales dependiendo del método podrán variar en número y longitud. A pesar de esto, las mismas presentan una alta tasa de error producida, no solo por el método de secuenciado, sino por las enzimas que deben de utilizarse durante la generación de la librería a analizar. Además de esto, debe considerarse que el error provocado por la técnica de secuenciación puede producir un error aproximado de 1%, 1-2 órdenes de magnitud mayor que la frecuencia de mutaciones de una gran variedad de virus de ARN, como por ejemplo el PV.

Es por esta razón que el diseño de librerías por biología molecular que nos permitan leer la misma secuencia, físicamente hablando, nos permite reducir de forma significativa el orden de magnitud de error. Exactamente por dos órdenes de magnitud para cada lectura adicional de la misma secuencia viral. El diseño de esta novedosa metodología podrá en un futuro estimar de forma precisa por primera vez la frecuencia de mutaciones de una cuasiespcie viral. Lo más importante de esto serán las preguntas biológicas que podrán responderse bajo el uso de esta metodología, como ser la influencia real del uso de mutágenos y antivirales, o el cambio en factores externos, como la temperatura o el PH, en la estructura de una población viral.

Actualmente estos estudios continúan en el Laboratorio del Dr. Raul Andino y prevemos la realización de importantes publicaciones derivadas de los mismos.

## 8. Conclusiones

---

Con respecto al análisis de variabilidad genética y modo de evolución de VLB en el Uruguay y en la región:

- Los resultados obtenidos del análisis de las primeras secuencias de gp51 de VLB obtenidas en Uruguay, permiten agrupar las mismas dentro del genotipo 1.
- Confirman y revelan la presencia de siete genotipos diferentes.
- La co-circulación de diferentes linajes en localizaciones geográficas específicas.
- Sustituciones específicas sobre el RBD de gp51 mapeadas en el 2do dominio de neutralización viral.
- Una diversificación en aumento de VLB en América del Sur con la presencia de los 7 genotipos descritos.

Dicho trabajo fue publicado en una revista internacional arbitrada (ver Anexo II)

**Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes.** Moratorio G, Obal G, Dubra A, Correa A, Bianchi S, Buschiazzo A, Cristina J, Pritsch O. *Archives of Virology* **155**(4):481-9. 2010

Estos resultados nos llevaron al desarrollo de una metodología para obtener la información completa del genoma proviral de VLB y a la expresión de la proteína de superficie viral gp51.

Con respecto a la caracterización molecular de genomas provirales de VLB extraídos de linfomas:

- Se desarrolló un método de amplificación, clonación y secuenciación de genomas provirales de VLB.
- Estos genomas representan las primeras secuencias completas de VLB extraídas directamente de un linfoma y reportada en la base de datos (actualmente protegidas con fecha de liberación para diciembre del 2012)

- Se identificaron mutaciones características de estas estirpes en diferentes regiones del genoma, e hipotetizó su posible rol en el desarrollo oncogénico de esta enfermedad.
- En esta tesis se discuten dos de estas secuencias completas pero hemos llegado a analizar una tercera la cual se encuentra en el manuscrito (ver Anexoll) enviado a una revista internacional arbitrada (BMC Research Notes) con los resultados finales obtenidos

Con respecto a la expresión y purificación de la proteína gp51 de VLB:

- Se realizó la construcción pSV2k-gp 51 y se transfectó de forma estable en células X63 ,lamentablemente no pudo detectarse la proteína y únicamente se obtuvo el ARN mensajero de la misma
- Mediante la construcción pET21 d-gp51, se expresó y purificó la proteína gp 51 de VLB, la misma podrá utilizarse como una herramienta para desarrollar un kit diagnóstico a nivel nacional que contemple las variantes de la misma que circulan en nuestro país.

Con respecto a la construcción de librerías moleculares para el estudio de cuasiespecies de virus ARN:

- Fue posible desarrollar librerías que reduzcan significativamente el error de secuencia y por lo tanto poder por primera vez, calcular la tasa de mutaciones de una cuasiespecie viral de forma precisa.
- Esta metodología podrá ser empleada para responder importantes preguntas de la biología viral como cual es la verdadera dimensión y estructura

poblacional de una cuasiespecie viral durante una infección o bajo la acción de diferentes presiones como ser mutágenos y-o antivirales.

- La metodología descrita será de gran importancia para entender los comprender los mecanismos moleculares que subyacen en la dinámica, interacción y evolución de cuasiespecies de virus ARN, los cuales son de fundamental importancia para el diseño de nuevas y efectivas estrategias antivirales.
- Este método podrá ser utilizado para la gran mayoría de virus ARN.
- Prevemos importantes publicaciones futuras a partir de estos valiosos y excitantes resultados obtenidos durante el desarrollo de esta metodología.

Finalmente, esta tesis representa el primer ladrillo del desarrollo de una línea de investigación sobre el VLB mediante la creación de un grupo multidisciplinario enfocado en el estudio de la epidemiología y fisiopatología de la LBE, su agente etiológico y el proceso oncogénico que desencadena.

## Abreviaturas

°C	Grados Celsius
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
Ag	Antígeno
AL	Aleucémico
aLRT	prueba aproximada de la razón de la verosimilitud ( <i>approximate Likelihood Ratio Test</i> )
APdA	ARN polimerasa dependiente de ARN
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BIV	Virus de la inmunodeficiencia en bovinos
BoLA	Antígeno Linfocitario Bovino ( <i>Bovine Lymphocyte Antigen</i> )
c.s.p.	cantidad suficiente para
CAEV	Virus de la Artritis-Encefalitis Caprina
CRE	elemento de respuesta a AMP-cíclico
DAS	secuencias activadoras corriente abajo
DO	Densidad óptica
DOPE	Energía Optimizada Discreta de la Proteína ( <i>Discrete Optimized Protein Energy</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIAV	Virus de la anemia infecciosa equina
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
<i>env</i>	gen codificante de la glicoproteína gp 51 de envoltura
F-MLV	Virus de la Leucemia Murina de Friend
FIV	Virus de la Inmunodeficiencia en Felinos
FLK	Células de riñon fetal ovino ( <i>Fetal Lamb Kidney cells</i> )
g	Aceleración de la gravedad
<i>gag</i>	antígeno grupo específico ( <i>group-associated antigen</i> )
gp 30	glicoproteína transmembrana de VLB
gp 51	glicoproteína de superficie de VLB
gp 51-ELISA	Prueba de ELISA que detecta anticuerpos contra la gp 51 de BLV
GRE	Elemento de Respuesta a Glucocorticoides
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humanos
hr	hora/s
HTLV	Virus de la Leucemia de células T de los Humanos
IDGA	Inmunodifusión en gel de agar
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil Tiogalactósido
kb	kilopares de bases
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertoni
LBE	Leucosis Bovina Enzoótica
LP	Linfocitosis Persistente
LS	Linfosarcoma
LTR	Repetidos Terminales Largos ( <i>Long terminal repeats</i> )
mA	mili Amperes
MCMC	Cadenas de Markov Monte Carlo
MDBK	Riñon Bovino Madin-Darby ( <i>Madin-Darby Bovine Kidney</i> )
mg	miligramo/s
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
min	minuto/s
ml	mililitro/s
MLV	Virus de la Leucemia Murina
mm	milímetro/s
mM	mili Molar

ND	No Determinado
NES	Señal de Exportación Nuclear
ng	nanogramo/s
NLS	Señal de Localización Nuclear
nm	nanómetro/s
NR	No Reportado
OIE	Organización mundial de sanidad animal ( <i>Office International des Épizooties</i> )
PAQ	Análisis de Partición de Cuasiespecies ( <i>Partition Analysis of Quasiespecies</i> )
p/v	peso en volúmen
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida ( <i>Polyacrialmide gel electroforesis</i> )
pb	pares de bases
PBF	<i>plasma BLV-blocking factor</i>
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica ( <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Solución amortiguadora de fosfato ( <i>Phosphate buffered salt</i> )
PFU	Unidad Formadora de Placas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
pH	potencial de Hidrógeno
PNK	Polinucleótido Quinasa
<i>pol</i>	gen de la polimerasa ( <i>polymerase</i> )
<i>prot</i>	proteasa
PV	Virus Polio
PVDF	polifluoruro de vinilideno ( <i>polivynilidene difluoride</i> )
RBD	Dominio de unión al Receptor ( <i>Receptor Binding Domain</i> )
RDL	Recuento Leucocítico Diferencial
RFLP	Polimorfismos en el Largo de los Fragmentos de Restricción
RIN	RNA Integrity Number
rp24	p24 recombinante
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscripción + PCR
SDS	Dodecil sulfafo de sodio ( <i>sodium docecil sulfate</i> )
SDS-PAGE	PAGE en presencia de SDS
seg	segundo/s
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agrolimentaria
SFV	Virus espumoso de los simios
SIV	Virus de la Inmunodeficiencia en Simios
SNV	Virus de la Necrosis del Bazo
SNP	Polimorfismo Simple de Nucleótidos
STLV	Virus de la Leucemia de células T de los Simios
SU	glicoproteínas gp 51 de superficie
SFB	Suero Fetal Bovino
TA	Temperatura Ambiente
TM	glicoproteínas gp 30 transmembrana
TxRE	Elemento de Respuesta a Tax
U	Unidad/es
μl	microlitro/s
USDA	Departamento de Agricultura de Estados Unidos
UV	Ultravioleta
V	Voltio/s
VDVB	Virus de la Diarrea Viral Bovina
VESPA	Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis
VISNA	Virus Visna-Maedi
VLB	Virus de la Leucosis Bovina ( <i>Bovine Leukemia Virus</i> )

## 12. Bibliografía

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abreu V.L.V., Silva J.A., Modena C.M., Moreira É.C., Figueiredo M.M.N. 1990. Prevalência da leucose enzoótica bovina nos estados de Rondônia e Acre. *Arq bras med vet zootec* 42: 203-210.
- Adam E., Kerkhofs P., Mammerickx M., Kettmann R., Burny A., Droogmans L., Willems L. 1994. Involvement of the cyclic AMP-responsive element binding protein in bovine leukemia virus expression in vivo. *J Virol* 68: 5845-5853.
- Alexandersen S., Carpenter S., Christensen J., Storgaard T., Viuff B., Wannemuehler Y., Belousov J., Roth J.A. 1993. Identification of alternatively spliced mRNAs encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus. *J Virol* 67: 39-52.
- Alfonso R., Almansa J.E., Barrera J.C. 1998. Serological prevalence and evaluation of the risk factors of bovine enzootic leukosis in the Bogotá savannah and the Ubaté and Chiquinquirá Valleys, Colombia. *Rev Sci Tech* 17: 723-732.
- Altaner C., Merza M., Altanerova V., Morein B. 1993. Envelope glycoprotein gp51 of bovine leukemia virus is differently glycosylated in cells of various species and organ origin. *Vet Immunol Immunopat* 36: 163-177.
- Anisimova M., Gascuel O. 2006. Approximate likelihood ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539-552.
- Asfaw Y., Tsuduku S., Konishi M., Murakami K., Tsuboi T., Wu D., Sentsui H. 2005. Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan. *Arch Virol* 150: 493-505.
- Avidan O., Meer M.E., Oz I., Hizi A. 2002. The processivity and fidelity of DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus. *Eur J Biochem* 269: 859-867.

- Baccam P., Thompson R. J., Fedrigo O., Carpenter S., Cornette J.L. 2001. PAQ: partition analysis of quasispecies. *Bioinformatics* 17: 16–22.
- Baccam P., Thompson R.J., Li Y., Sparks W.O., Belshan M., Dorman K.S., Wannemuehler Y., Oaks J.L., Cornette J.L., Carpenter S. 2003. Subpopulations of equine infectious anemia virus Rev coexist in vivo and differ in phenotype. *J Virol* 77: 12122–12131.
- Bagossi P., Sperka T., Feher A., Kadas J., Zahuczky G., Miklossy G., Boross P., Tozser J. 2005. Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *J Virol* 79: 4213-4218.
- Ballagi-Pordany A., Klintevall K., Merza M., Klingeborn B., Belak S. 1992. Direct detection of bovine leukemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *Zentralbl Veterinarmed* 39: 69–77.
- Ban J., Czene S., Altaner C., Callebaut I., Krchnak V., Merza M., Burny A., Kettmann R., Portetelle D. 1992. Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein expressed in *Escherichia coli* by means of antipeptide antibodies. *J Virol* 373: 2457-2464.
- Barros C.S.L., Lemos R.A.A. 1998. Leucose Viral Bovina. En: Lemos, R. A. A. Principais enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: Reconhecimento e Diagnóstico. Campo Grande: *Univ. Fed. De MS*, pp 366-385.
- Bartenschlager R., Lohmann V. 2000. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 14: 241-254.
- Beasley B.E., Hu W.S. 2002. *Cis*-Acting elements important for retroviral RNA packaging specificity. *J Virol* 76: 4950-4960.
- Beier D., Blanckstein P., Marquardt O., Kuzmak J. 2001. Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP, and DNA sequencing. *Berl Munch Tierarztl Wschr* 114: 252–256.
- Beier D. 2008. Enzootic Bovine Leucosis. En: Vallat, B. Manual of diagnostic tests and

- vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 2a. ed. Paris, Ed. OIE, pp 723-738.
- Bhattacharyya S., Habermacher R., Martine U., Closs E., Filipowicz W. 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125: 1111–1124.
- Biebricher C.K., Eigen M. 2005. The error threshold. *Virus Res* 107: 117-27.
- Biebricher C.K., Eigen M. 2006. What is a quasispecies? *Curr Top Microbiol Immunol* 299: 1-31.
- Brasseur R., Cornet B., Burny A., Vandenbranden M., Ruyschaert J.M. 1988. Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *AIDS Res Hum Retroviruses* 4: 83-90.
- Bregues M., Teixeira D., Parker R. 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310: 486–489.
- Brenner J., Van-Haam M., Savir D., Trainin Z. 1989. The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. *Vet Immunol Immunopathol* 22: 299-305.
- Brooks P.A., Nyborg J.K., Cockerell G.L. 1995. Identification of an NF-kappa B binding site in the bovine leukemia virus promoter. *J Virol* 69: 6005–6009.
- Bruck D., Portetelle D., Burny A., Zavada J. 1982a. Topographical analysis by monoclonal antibodies of BLV gp51 epitopes involved in viral functions. *Virology* 122: 353-362.
- Bruck C., Mathot S., Portetelle D., Berte C., Franssen J.D., Herion P., Burny A. 1982b. Monoclonal antibodies define independent antigenic regions of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology* 122: 342-352.

- Bruck C., Portetelle D., Zavada J., Burny A. 1983. Molecular dissection of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (BLV gp51) by a monoclonal antibody study. *Haematol Blood Transf* 28: 222-226.
- Brunner M.A., Lein D.H., Dubovi E.J. 1997. Experiences with the New York State Bovine Leukosis virus eradication and certification program. *Vet Clin North Am* 13: 143-150.
- Buehring G., Philpott S., Choi Y. 2003. Human have antibodies reactive with Bovine Leukemia Virus. *AIDS res hum retroviruses*. 19: 1005-1113
- Burny A., Bex F., Chantrenne H., Cleuter Y., Dekegel D., Ghysdael J., Kettmann R., Leclercq M., Leunen J., Mammerickx M., Portetelle D. 1978. Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Adv Cancer Res* 28: 251–311.
- Burny A., Bruck C., Chantrenne H., Cleuter Y., Dekegel D., Ghysdael J., Kettmann R., Leclercq M., Leunen J., Mammerickx M., Portetelle D. 1980. Bovine leukemia virus: Molecular biology and epidemiology. In *Viral oncology* (ed. G. Klein). Raven Press, New York, pp 231-289.
- Burny A., Cleuter Y., Kettmann R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D, van den Broeke A., Willems L., Thomas R. 1987. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Cancer Surv* 6: 139–159.
- Burny A., Cleuter Y., Kettmann R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D., Van den Broeke A., Willems L., Thomas R. 1988. Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med* 32: 149-70.
- Burridge M., Thurmond M., Miller J., Schmerr M., Van Der Maaten M. 1982. Duration of colostral Antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am J Vet Res* 10: 1866-7.

- Callebaut I., Burny A., Krchnak V., Gras-Masse H., Wathelet B., Portetelle D. 1991. Use of synthetic peptides to map sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein. *Virology* 185: 48-55.
- Callebaut I., Voneche V., Mager A., Fumiere O., Krchnak V., Merza M., Zavada J., Mammerickx M., Burny A., Portetelle D. 1993. Mapping of B neutralizing and T-helper epitopes on the bovine leukaemia virus external glycoprotein gp51. *J Virol* 67: 5321–5327.
- Calomme C., Dekoninck A., Nizet S., Adam E., Nguyen T., Van Den Broeke A., Willems L., Kettmann R., Burny A., Van Lint C. 2004. Overlapping CRE and E Box motifs in the enhancer sequences of the Bovine Leukemia Virus 5' long terminal repeat are critical for basal and acetylation-dependent transcriptional activity of the viral promoter: implications for viral latency. *J Virol* 78: 13848-13864.
- Camargos M.F., Stancek D., Rocha M.A., Lessa L.M., Reis J.K., Leite R.C. 2002. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49: 325–331.
- Camargos M.F., Pereda A., Stancek D., Rocha M.A., Reis J.K., Greiser-Wilke I., Leite R.C. 2007. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of bovine leukaemia virus. *Virus Genes* 34: 343–350.
- Choi E.A., Hope T.J. 2005. Mutational analysis of bovine leukemia virus Rex: identification of a dominant-negative inhibitor. *J Virol* 79: 7172-7181.
- Coffin J.M. 1994. Structure and Classification of Retroviruses. En: *The Retroviridae*. Plenum Press (ed.) pp 19-49.
- Colin L., Dekoninck A., Reichert M., Calao M., Merimi M., Van den Broeke A., Vierendeel V., Cleuter Y., Burny A., Rohr O., Van Lint C. 2011. Chromatin disruption in the promoter of Bovine Leukemia Virus during transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* 39: 9559-9573.
- Collazo L., Sienna R., Irabuena O., Guarino H., Navarro M., Lavarello L. 2002. Estudio

- epidemiológico de la Leucosis Bovina Enzoótica en Ganado lechero. *Jorn. Urug. Buiatría XXX*. Paysandú, Uruguay pp 322-325.
- Costa-Mattioli M., Domingo E., Cristina J. 2006. Analysis of sequential hepatitis A virus strains reveals coexistence of distinct viral subpopulations. *J Gen Virol* 87: 115–118
- Coulston J., Naif H., Brandon R., Kumar S., Khan S., Daniel R., Lavin M. 1990. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *J Gen Virol* 71: 1737–1746.
- Da Y., Shanks D., Steward J.A., Lewin H.A. 1993. Milk and fat decline in bovine Leukemia virus-infected Holstein cattle with Persistent Lymphocytosis. *Proc Natl Acad Sci* 90: 6538-6541.
- De Giuseppe A., Feliziani F., Rutili D., De Mia G.M. 2004. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 147-151.
- Dekoninck A., Calomme C., Nizet S., de Launoit Y., Burny A., Ghysdael J., Van Lint C. 2003. Identification and characterization of a PU.1/Spi-B binding site in the bovine leukemia virus long terminal repeat. *Oncogene* 22: 2882-2896.
- Del Fava C., Pituco E.M. 2004. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. *O Biológico* 66: 1-8.
- Derse D. 1987. Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. *J Virol* 61: 2462-2471.
- Derse D. 1988. Trans-acting regulation of bovine leukemia virus mRNA processing. *J. Virol.* 62: 1115-1119.
- Detilleux J.C., Freeman A.E., Miller L.D. 1991. Comparison of natural transmission of bovine leukaemia virus in Holstein cows or two genetic lines selected for high and average milk production. *AM J Vet Res* 52: 1551-1559.

- DiGiacomo R.F. 1992. Vertical transmission of the bovine leukemia virus. *Vet. Med.* 87: 258-262.
- Dimmock C.K., Chung Y.S., MacKenzie A.R. 1991. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Aust Vet J* 68: 230-233.
- Domingo E., Martin V., Perales C., Grande-Perez A., García-Arriza J., Arias A. 2006. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 299: 51-82.
- Domingo E., Gómez J. 2007. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res* 127: 131-150.
- D'Souza V., Melamed J., Habib D., Pullen K., Wallace K., Summers M.F. 2001. Identification of a high affinity nucleocapsid protein binding element within the Moloney murine leukemia virus Psi-RNA packaging signal: implications for genome recognition. *J Mol Biol* 314: 217-232.
- Dube S., Dolcini G., Abbott L., Mehta S., Dube D., Gutierrez S., Ceriani C., Esteban E., Ferrer J., Poiesz B. 2000. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology* 277: 379-386.
- Dube S., Abbott L., Dube D.K., Dolcini G., Gutierrez S., Ceriani C., Juliarena M., Ferrer J., Perzova R., Poiesz B.J. 2009. The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain. *Virology* 6: 120.
- Eigen M., Schuster P. 1979. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Springer, Berlin.
- Eigen M., Gardiner W., Schuster P., Winkler-Oswatitsch R. 1981. The origin of genetic information. *Sci Am* 244: 88-92.

- Eswar N., Marti-Renom M.A., Webb B., Madhusudhan M.S., Eramian D., Shen M., Pieper U., Sali A. 2006. Comparative protein structure modeling with MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc.
- Fass D., Davey R.A., Hamson C.A., Kim P.S., Cunningham J.M., Berger J.M. 1997. Structure of a murine leukemia virus receptorbinding glycoprotein at 2.0 angstrom resolution. *Science* 277: 1662–1666.
- Fechner H., Kurg A., Geue L., Blankenstein P. 1996. Evaluation of Polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J. Vet. Med.* 43: 621-630.
- Fechner H., Blankenstein P., Looman A.C., Elwert J., Geue L., Albrecht C., Kurg A., Beier D., Marquardt O., Ebner D. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 237: 261–269.
- Felmer R., Muñoz G., Zuñiga J., Recabal M. 2005. Molecular analysis of 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp 51 *env* gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Vet Microb* 108: 39–47.
- Felmer R., Zúñiga J., Recabal M. 2006. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de leche, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.* 38: 137-141.
- Fenner F.J., Gibbs E.J., Murphy F.A. 1993. Herpesviridae. En: Fenner, F. *Veterinary virology*. 2 ed. New York: Academic Press pp 335-368.
- Ferrer J.F. 1980. Bovine lymphosarcoma. *Adv Vet Sci Comp Med* 24: 1-68.
- Ferrer J.F., Cabradilla C., Gupta P. 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: 9-14.

- Knipe D., Howley P. 2007. *Fields Virology*, 5th Ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Finn R.D., Mistry J., Schuster-Böckler B., Griffiths-Jones S., Hollich V., Lassmann T., Moxon S., Marshall M., Khanna A., Durbin R., Eddy S.R., Sonnhammer E.L., Bateman A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* 34: D247–D251.
- Florins A., Gillet N., Asquith B., Boxus M., Burteau C., Twizere J.C., Urbain P., Vandermeers F., Debacq C., Sanchez-Alcaraz M.T., Schwartz-Cornil I., Kerkhofs P., Jean G., Théwis A., Hay J., Mortreux F., Wattel E., Reichert M., Burny A., Kettmann R., Bangham C., Willems L. 2007. Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci* 12: 1520-1531.
- Gallaher W.R., Ball J.M., Garry R.F., Martin-Amedee A.M., Montelaro R.C. 1995. A general model for the surface glycoproteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 191-202.
- Gatot J.S., Callebaut I., Van Lint C., Demonte D., Kerkhofs P., Portetelle D., Burny A., Willems L., Kettman R. 2002. Bovine leukaemia Virus SU protein interacts with Zinc, and mutations within two interacting regions differently affect viral fusion and infectivity in vivo. *J Virol* 76: 7956–7967.
- Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., Balon H., Bouzar A.B., Defoiche J., Burny A., Reichert M., Kettmann R., Willems L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in humans. *Retrovirol* 4: 18-49.
- González E.T., Oliva G.A., Valera A., Bonzo E., Licursi M., Etcheverrigaray M.E. 2001. Leucosis enzoótica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-i, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria* 21: 12-20.
- Guarino H. 2001. Plan Piloto de monitoreo en lechería. Principales enfermedades infecciosas en la cuenca lechera de Florida. *Revista del Plan Agropecuario* 96: 64.

- Guindon S., Lethiec F., Duroux P., Gascuel O. 2005. PHYML Online - a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33: W557–W559.
- Gupta P., Ferrer J.F. 1982. Expression of bovine leukemia virus genome is blocked by a nonimmunoglobulin protein in plasma from infected cattle. *Sci* 215: 405-407.
- Gupta P., Kashmiri S.V., Ferrer J.F. 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.
- Haas L., Divers T., Casey J. 1992. Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *J Virol* 66: 6223-6225.
- Hizi A., Herschhorn A. 2008. Retroviral reverse transcriptases (other than those of HIV-1 and murine leukemia virus): a comparison of their molecular and biochemical properties. *Virus Res* 134: 203-229.
- Hopkins S.G., DiGiacomo R.F. 1997. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13: 107-128.
- Hopkins S.G., DiGiacomo R.F., Evermann J.F., Christensen J.D., Deitelhoff D.P., Mickelsen W.D. 1991. Rectal palpation and transmission of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 199: 1035-1038.
- Huber N.L., DiGiacomo R.F., Evermann J.F., Studer E. 1981. Bovine Leukemia virus infection in a large Holstein herd: prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows. *Am J Vet Res* 42: 1477-1481.
- Hübner S.O., Weiblen R., Tobias F.L., Cancian N., Botton S.A., Oliveira M., Zanini M. 1996. Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *Pesq Vet Bras* 16: 87-90.

- ICTVdB Management. 2006. 00.061.1.05. Deltaretrovirus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- Islas L.A., Inchaurtieta S.C., Muñoz P.G. 1990. Prevalencia de leucosis enzoótica bovina (LEB) en lecherías de las comunas de San Fernando, Chimbarongo y Placilla. *Monografías de Medicina Veterinaria* 12, 1.
- Jacobs R.M., Heeney J.L., Godkin M.A., Leslie K.E., Taylor J.A., Davies C., Valli V.E.O. 1991. Production and related variables in Bovine Leukemia virus-infected cows. *Vet Res Commun* 15: 463-474.
- Jacobs R.M., Pollari F.L., McNab W.B., Jefferson B. 1995. A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can J Vet Res* 59: 271-278.
- Jensen W., Sheehy S., Fox M., Davis W., Cockerell G. 1990. In vitro expression of bovine leukemia virus in isolated B lymphocytes of cattle and sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 26: 333-342.
- Jewell N.A., Mansky L.M. 2000. In the beginning: Genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *J Gen Virol* 81: 1889–1899.
- Johnson R., Kaneene J. 1992. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Veterinary Bulletin* 62: 287-312.
- Johnston E.R., Radke K. 2000. The SU and TM Envelope Protein Subunits of Bovine Leukemia Virus Are Linked by Disulfide Bonds, both in Cells and in virions. *J Virol* 74: 2930–2935.
- Johnston E.R., Albritton L.M., Radke K. 2002. Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of Bovine Leukemia Virus surface protein. *J Virol* 76: 10861-10872.

- Keane T.M., Creevey C.J., Pentony M.M., Naughton T.J., McInerney J.O. 2006. Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* 6: 29.
- Kerkhofs P., Heremans H., Burny A., Kettmann R., Willens L. 1998. In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J Virol* 72: 2554-2559.
- Kettmann R., Burny A., Callenbaut I., Droogmans L., Mammerckx M., Willems I., Portetelle D. 1994. Bovine Leukemia Virus. En: J.A. Levy (ed.) *The Retroviridae*. Plenum Press, New York, N.Y. pp 39-81.
- Kiermer V., Van Lint C., Briclet D., Vanhulle C., Kettmann R., Verdin E., Burny A., Droogmans L. 1998. An interferon regulatory factor binding site in the U5 region of the bovine leukemia virus long terminal repeat stimulates Tax-independent gene expression. *J Virol* 72: 5526-5534.
- Kim F.J., Beeche A.A., Hunter J.J., Chin D.J., Hope T.J. 1996. Characterization of the nuclear export signal of human T-cell lymphotropic virus type 1 Rex reveals that nuclear export is mediated by position-variable hydrophobic interactions. *Mol Cell Biol* 16: 5147-5155.
- Kiss-Toth E., Unk I. 1994. A downstream regulatory element activates the bovine leukemia virus promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1553-1561.
- Korber B., Myers G. 1992. Signature Pattern Analysis: a Method for Assessing Viral Sequence Relatedness. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1549–1560.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. 2007. MEGA 4: integrated software for Molecular Evolutionary Genetic Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinf* 5: 150–163.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lamb D., Schuttelkopf A.W., van Aalten D.M.F., Brighty D.W. 2011. Charge-surrounded pockets and electrostatic interactions with small ions modulate the activity of retroviral fusion proteins. *PLoS Pathog* 7: e1001268.
- Lassauzet M.L.G., Johnson W.O., Thurmond M.C., Stevens F. 1989. Protection of colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Can J Vet Res* 53: 424-430.
- Lavanya M., Kinet S., Montel-Hagen A., Mongellaz C., Battini J., Sitbon M., Taylor N. 2008. Cell surface expression of the bovine leukemia virus-binding receptor on B and T lymphocytes is induced by receptor engagement. *J Immunol* 181: 891-898.
- Lefebvre L., Ciminale V., Vanderplasschen A., D'Agostino D., Burny A., Willems L., Kettmann R. 2002a. Subcellular localization of the Bovine Leukemia Virus R3 and G4 accessory proteins. *J Virol* 76: 7843-7854.
- Lefebvre L., Vanderplasschen A., Ciminale V., Heremans H., Dangoisse O., Jauniaux J.C., Toussaint J.F., Zelnik V., Burny A., Kettmann R., Willems L. 2002b. Oncoviral bovine leukemia virus G4 and human T-cell leukemia virus type 1 p13(II) accessory proteins interact with farnesyl pyrophosphate synthetase. *J Virol* 76: 1400-1414.
- Le Guillou-Guillemette H., Vallet S., Gaudy-Graffin C., Payan C., Pivert A., Goudeau A., Lunel-Fabiani F. 2007. Genetic diversity of the hepatitis C virus: Impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13: 2416-2426.
- Leis J., Baltimore D., Bishop J.M., Coffin J., Fleigsner E., Goff S.P., Oroszlan S., Robinson H., Skalka A.M., Temin H.I., Vogt V. 1988. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol* 62: 1808-1809.
- Licursi M., Inoshima Y., Wu D., Yokoyama T., González E.T., Sentsui H. 2002. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus Res* 86: 101-110.

- Licursi M., Inoshima Y., Wu D., Yokoyama T., González E.T., Sentsui H. 2003. Provirus variants of bovine leukaemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet Microbiol* 96: 17–23.
- Llames L., Goyache J., Domenech A., Arjona A., Suarez G., Gomez-Lucia E. 2001. Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. *J Clin Virol* 22: 31-39.
- Lole K.S., Bollinger R.C., Paranjape R.S., Gadkari D., Kulkarni S.S., Novak N.G., Ingersoll R., Sheppard H.W., Ray S.C. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73: 152-60.
- Luciw P., Leung N. 1994. Mechanisms of Retrovirus Replication. En: *The Retroviridae*. Plenum Press pp 159-263.
- Mammerickx M. 1970. Sur l'utilisation du mouton pour les expériences sur la leucose bovine. *Exp Anim* 3: 285.
- Mammerickx M., Portetelle D., de Clercq K., Burny A. 1987. Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk Res* 11: 353-358.
- Mamoun R.Z., Morisson M., Rebeyrotte N., Busetta B., Couez D., Kettmann R., Hospital M., Guillemain B. 1990. Sequence variability of bovine leukemia virus *env* gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J Virol* 64: 4180-4188.
- Marin C., DeLopez N.M., Alvarez L., Lozano O., Espana W., Castanos H., Leon A. 1978. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann Rech Vet* 9: 743-746.
- Martin D., Arjona A., Soto I., Barquero N., Viana M., Gómez-Lucía E. 2001. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the

- detection of bovine leukaemia virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48: 97-106.
- Massari M.E., Murre C. 2000. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Mol Cell Biol* 20: 429-440.
- Melo L.E.H. 1992. Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no agreste meridional do estado de Pernambuco. *Braz J Vet Res Anim Sci* 29: 157-158.
- Merezak C., Pierreux C., Adam E., Lemaigre F., Rousseau G.G., Calomme C., Van Lint C., Christophe D., Kerkhofs P., Burny A., Kettmann R., Willems L. 2001. Suboptimal enhancer sequences are required for efficient bovine leukemia virus propagation in vivo: implications for viral latency. *J Virol* 75: 6977-6988.
- Merimi M., Klener P., Szynal M., Cleuter Y., Bagnis C., Kerkhofs P., Burny A., Martiat P., Van den Broeke A. 2007. Complete suppression of viral gene expression is associated with the onset and progression of lymphoid malignancy: observations in Bovine Leukemia Virus-intected sheep. *Retrovirol* 4: e51.
- Miller J.M., Miller L.D., Olson C., Gillette K. 1969. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 43: 1297-1305.
- Miller J., Olson C. 1972. Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine leukemia virus. *J Natl Cancer Inst* 43: 1459-1462.
- Miller J.M., Van Der Maaten M.J. 1975. Serologic response of cattle following inoculation with bovine leukemia virus. *Bibl Haematol* 43: 187-189.
- Miller L.D., Miller J.M., Van der Maaten M.J., Schmerr M.J. 1985. Blood from bovine leukemia virus-infected cattle: antigen production correlated with infectivity. *Am J Vet Res* 46: 808-810.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting

- DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 12: 319-325.
- Molteni E., Agresti A., Meneveri R., Marozzi A., Malcovati M., Bonizzi L., Poli G., Ginelli E. 1996. Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). *Zentralbl Veterinarmed B* 43: 201–211.
- Monti G., Schrijver R., Beier D. 2005. Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. *Arch Virol* 150: 443–458.
- Moratorio G., Martínez M., Gutiérrez M.F., González K., Colina R., López-Tort F., López L., Recarey R., Schijman A.G., Moreno M.P., García-Aguirre L., Manascero A.R., Cristina J. 2007. Evolution of naturally occurring 5'non-coding region variants of Hepatitis C virus in human populations of the South American region. *Virology* 79: 1-12.
- Nagy P.D., Simon A.E. 1997. New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 235: 1-9.
- Nguyen T.L., de Walque S., Veithen E., Dekoninck A., Martinelli V., de Launoit Y., Burny A., Harrod R., Van Lint C. 2007. Transcriptional regulation of the bovine leukemia virus promoter by the cyclic AMP-response element modulator tau isoform. *J Biol Chem* 282: 20854-20867.
- Niermann G.L., Buehring G.C. 1997. Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. *Virology* 239: 249-258.
- Olson C. 1961. Studien über das Auftreten und die Verbreitung der Rinderleukose in Schweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2: 13-46.
- Ott S.L., Johnson R., Wells S.J. 2003. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med* 61: 249-62.
- Pelzer K.D., Sprecher D.J. 1993. Controlling BLV infection on dairy operations. *Vet Med* 275-281.

- Pelzer K.D. 1997. Economics of bovine leukemia virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13: 129-124.
- Perino L.J., Wright R.E., Hoppe K.L., Fulton R.W. 1990. Bovine leukosis virus transmission with mouthparts from *Tabanus abactor* after interrupted feeding. *Am J Vet Res* 51: 1167-1169.
- Picard L., Simmons G., Power C.A., Meyer A., Weiss R.A., Clapham P.R. 1997. Multiple extracellular domains of CCR-5 contribute to human immunodeficiency virus type 1 entry and fusion. *J Virol* 71: 5003–5011.
- Pierard V., Guiguen A., Colin L., Wijmeersch G., Vanhulle C., Van Driessche B., Dekoninck A., Blazkova J., Cardona C., Merimi M., Vierendeel V., Calomme C., Nguyen T., Nuttinck M., Twizere J.C., Kettmann R., Portetelle D., Burny A., Hirsch I., Rohr O., Van Lint C. 2010. DNA cytosine methylation in the Bovine Leukemia Virus promoter is associated with latency in a lymphoma-derived B-cell line. *J Biol Chem* 285: 19434-19449.
- Pollari F.L., Waugsuphachart V.L., DiGiacomo R.F., Evemann J.F. 1992. Effects of Bovine Leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. *Can J Vet Res* 56: 289-295.
- Portetelle E., Mammerickx M., Burny A. 1989. Use of two monoclonal antibodies in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus envelope protein gp 51. *J Virol Meth* 23: 211–222.
- Racaniello V.R. 2007. Picornaviridae: the virus and their replication. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia pp 795–838.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. 2002. *Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9ª ed. pp 1534, 1971-1974. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana. Madrid, España.

- Rama G., Meikle A., Puentes R., Moratorio G., Nicolini P., Pessina P., Furtado A., Pritsch O. 2010. Aspectos sobre el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Veterinaria (Montevideo)* 46: 15-22.
- Rama G., Pritsch O., Adrien M.L., Moratorio G., Meikle A. 2012. Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Veterinaria (Montevideo)* 48: 11-17.
- Ren J., Bird L.E., Chamberlain P.P., Stewart-Jones G.B., Stuart D.I., Stammers D.K. 2002. Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14410-14415.
- Rice N.R., Stephens R.M., Burny A., Gildea R.V. 1985. The *gag* and *pol* genes of bovine leukemia virus: nucleotide sequence and analysis. *Virology* 142: 357-377.
- Rhodes J.K., Pelzer K.D., Johnson Y.J. 2003. Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 223: 346-352.
- Rodríguez S.M., Golemba M.D., Campos R.H., Trono K., Jones L.R. 2009. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two new clades. *J Gen Virol* 90: 2788-2797.
- Rovnak J., Casey J. 1999. Assessment of bovine leukemia virus transcripts in vivo. *J Virol* 73: 8890-8897.
- Sagata N., Yasunaga T., Ohishi K., Tsuzuku-Kawamura J., Onuma M., Ikawa Y. 1984. Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *EMBO J* 3: 3231-3237.
- Sagata N., Yasunaga T., Ikawa Y. 1985a. Two distinct polypeptides may be translated from a single spliced mRNA of the X genes of human T-cell leukemia and bovine leukemia viruses. *FEBS Lett* 192: 37-42.

- Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku-Kawamura J., Ohishi K., Ogawa Y., Ikawa Y. 1985b. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 677-681.
- Sali A., Blundell T.L. 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779-815.
- Salminen, M. (1995) Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type I by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1423–1425.
- Sargeant J., Kelton D., Martin S., Mann E. 1997. Evaluation of a bulk-milk ELISA test for the classification of herd-level bovine leukemia virus status. *Prev Vet Med* 31: 223-230.
- Schwartz I., Bensaid A., Polack B., Perrin B., Berthelemy M., Levy D. 1994. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *J Virol* 68: 4589-4596.
- Scott M.L., Smith T.T., Kellogg D.W., Mauromoustakos A. 1990. Comparison of milk yield and quality of dairy cows that tested seropositive for bovine leukemia virus. *J Dairy Sci* 73(suppl.1): 262.
- Shimodaira H. 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst Biol* 51: 492–508.
- Shimodaira H., Hasegawa M. 2001. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* 17: 1246–1247.
- Shirley J.E., Smith J.F., Stokka G.L., Scoby R., Van Anne T. 1997. Bovine Leukosis. *Compend Cont Educ Pract Vet* 19: 651-654.
- Sienra R., Nuñez A., González A., Ceretta M.E., Guarino H., Morón C. 1998. Características Hematológicas en relación a la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en ganado Lechero. *Jorn Urug Buiatría XXVI*, Paysandú, Uruguay

pp 23-25.

- Sperka T., Miklossy G., Tie Y., Bagossi P., Zahuczky G., Boross P., Matuz K., Harrison R.W., Weber I.T., Tozser J. 2007. Bovine leukemia virus protease: comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus protease. *J Gen Virol* 88: 2052-2063.
- Tajima S., Aida Y. 2000. The region between amino acids 245 and 265 of the bovine leukemia virus (BLV) Tax protein restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retrovirus enhancers. *J Virol* 74: 10939-10949.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680.
- Tiscornia A.C., Cayota A., Landoni A.I., Brito C., Oppezso P., Vuillier F., Robillo C., Digiero G., Gabús R., Pritsch, O. 2004. Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia* 18: 48-56.
- Toma B., Eloit M., Savey M. 1990. Las enfermedades animales por retrovirus : leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/encefalitis caprina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 9: 1077-1119.
- Trono K.G., Pérez-Filgueira D.M., Duffy S., Borca M.V., Carrillo C. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 83: 235-248.
- Unk Y., Kiss-Toth E., Boros Y. 1994. Transcription factor AP-4 participates in activation of bovine leukemia virus long terminal repeats by p34Tax. *Nucleic Acids Res* 22: 4872-4875.
- Van Den Broeke A., Bagnis C., Ciesiolka M., Cleuter Y., Gelderblom H., Kerkhofs P., Griebel P., Mannoni P., Burny A. 1999. In vivo rescue of a silent tax-deficient

- bovine leukemia virus from a tumor-derived ovine B-cell line by recombination with a retrovirally transduced wild-type tax gene. *J Virol* 73: 1054–1065.
- Van den Heuvel M.J., Jefferson B.J., Jacobs R.M. 2005. Isolation of a bovine plasma fibronectin-containing complex which inhibits the expression of bovine leukemia virus p24. *J Virol* 79: 8164-8170.
- Van der Maaten M., Miller J. 1976. Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell culture. *Bibl Haematol* 43: 360-362.
- Varmus H. 1988. Retroviruses. *Science* 240: 1427-1435.
- Vignuzzi M., Stone J.K., Andino R. 2005. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res* 107: 173-181.
- Wallin M., Ekstrom M., Garoff H. 2004. Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *EMBO J* 23: 54-65.
- Wang H., Norris K.M., Mansky L.M. 2003. Involvement of the matrix and nucleocapsid domains of the bovine leukemia virus Gag polyprotein precursor in viral RNA packaging. *J Virol* 77: 9431-9438.
- Wentink G.H., Oirschot J.T., Pelgrim W., Wensing T., Gruys W.E. 1993. Experimental transmission of Bovine Leukosis virus by rectal palpation. *Vet Rec* 132: 135-136.
- Willems L., Gegonne A., Chen G., Burny A., Kettmann R., Ghysdael J. 1987. The bovine leukemia virus p34 is a transactivator protein. *EMBO J* 6: 3385-3389.
- Willems L., Chen G., Portetelle D., Mamoun R., Burny A., Kettmann R. 1989. Structural and functional characterization of mutants of the bovine leukemia virus transactivator protein p34. *Virology* 171: 615-618.

- Willems L., Heremans H., Chen G., Portetelle D., Billiau A., Burny A., Kettmann R. 1990. Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation. *EMBO J* 9: 1577-1581.
- Willems L.D., Kettmann R., Burny A. 1991. The amino acid (157-197) peptide segment of bovine leukemia virus p34tax encompass a leucine-rich globally neutral activation domain. *Oncogene* 6: 159-163.
- Willems L., Portetelle D., Kerkhofs P., Chen G., Burny A., Mammerickx M., Kettmann R. 1992. In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep. *Virology* 189: 775-777.
- Willems L., Thienpont E., Kerkhofs P., Burny A., Mammerickx M., Kettmann R. 1993. Bovine leukaemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability. *J Virol* 67: 1086–1089.
- Willems L., Kerkhofs P., Dequiedt F., Portetelle D., Mammerickx M., Burny A., Kettmann R. 1994. Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11532-11536.
- Willems L., Kerkhofs P., Burny A., Mammerickx M., Kettmann R. 1995. Lack of LTR and ENV genetic variation during bovine leukemia virus-induced leukemogenesis. *Virology* 206: 769-772.
- Worobey M., Holmes E.C. 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 80: 2535–2543.
- Wu M-C., Shanks R.D., Lewin H.A. 1989. Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical Bovine Leukemia Virus infection. *Proc Natl Acad Sci* 86: 993-996.
- Xiao J., Buehring G.C. 1998. In vivo protein binding and functional analysis of cis-acting elements in the U3 region of the bovine leukemia virus long terminal repeat. *J Virol* 72: 5994-6003.

- 
- Zaffaroni R., Piaggio J., Nuñez A., de Freitas J., Suanes A., Cernicchiaro N., Gil A. 2007. Evolución temporal de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) en la cuenca lechera sur del Uruguay. *V Jornadas técnicas veterinarias*, Montevideo, Uruguay pp 150-151.
- Zandomeni R.O., Carrera-Zandomeni M., Esteban E., Donawick W., Ferrer J.F. 1992. Induction and inhibition of bovine leukaemia virus expression in naturally infected cells. *J Gen Virol* 73: 1915-1924.
- Zandomeni R.O., Esteban E., Carrera-Zandomeni M., Ferrer J.F. 1994. Host soluble factors with blocking and stimulating activity on the expression of the bovine leukemia virus. *J Infect Dis* 170: 787-794.
- Zapp M.L., Hope T.J., Parslow T.G., Green M.R. 1991. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: A dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc Natl Acad Sci* 88: 7734–7738.
- Zhao X., Buehring G.C. 2007. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope genes: possible effects of selection and escape. *Virology* 15: 150–165.

# Índice general

1. Capítulo 1: Introducción General	1
1.1 La Leucosis Bovina Enzoótica.	2
1.1.1 La enfermedad.	2
1.1.2 Historia de la LBE.	3
1.1.3 Diagnóstico de la Leucosis Bovina Enzoótica.	4
1.1.4 Prevención y control.	6
1.2 El Virus de la Leucosis Bovina (VLB).	7
1.2.1 Clasificación.	7
1.2.2 Características estructurales.	9
1.2.3 Organización genómica.	10
1.2.4 Transcripción y eventos post-transcripcionales.	12
1.2.5 La glicoproteína gp 51.	15
1.2.6 Ciclo Replicativo.	16
1.3 Variabilidad Genética de VLB.	18
1.4 Epidemiología.	20
1.5 Situación en la región y en nuestro país.	22
1.6 Problemática de VLB.	23
2. Capítulo 2: Hipótesis de trabajo.	25
3. Capítulo 3: Objetivos.	27
3.1 Objetivo generales.	28
3.2 Objetivos específicos.	28
4. Capítulo 4: Variabilidad genética de VLB en Uruguay y en la región.	29
4.1 Resumen.	30
4.2 Marco teórico de la investigación.	31
4.3 Objetivo.	33
4.4 Materiales y métodos.	34
4.4.1 Toma y procesamiento de muestras.	34
4.4.2 Detección de anticuerpos anti-VLB.	34
4.4.3 IDGA.	34
4.4.4 ELISA.	35
4.4.5 Extracción de ADN.	35
4.4.6 Amplificación por PCR del gen env gp51.	35
4.4.7 Electroforesis en gel de agarosa.	36
4.4.8 Purificación del producto de PCR.	37
4.4.9 Clonación de los productos amplificados.	37
4.4.9.1 Ligación al vector de clonado <i>p-Gem T-Easy</i> .	37
4.4.9.2 Transformación de <i>E. coli</i> .	37

4.4.9.3	Plaqueo.	38
4.4.9.4	Reconocimiento por $\alpha$ -complementación.	38
4.4.9.5	Extracción del ADN plasmídico por Lisis Alcalina.	39
4.4.9.6	Confirmación de clones positivos.	40
4.4.10	Secuenciación.	40
4.4.11	Análisis filogenéticos.	41
4.4.12	Modelado estructural 3D de la proteína gp51 de VLB.	41
4.4.13	Numero de acceso de secuencias nucleotídicas.	42
4.5	Resultados.	45
4.5.1	Ensayo de ELISA.	45
4.5.2	Amplificación por PCR del gen <i>env</i> gp51.	45
4.5.3	Análisis filogenéticos de cepas de VLB.	46
4.5.4	Sustituciones aminoacídicas en la proteína <i>env</i> gp51 de cepas de VLB aisladas en Sudamérica.	52
4.5.5	Modelado 3D del RBD de <i>env</i> gp51.	52
4.6	Discusión.	56
5.	Capítulo 5: Caracterización molecular de genomas completos de VLB extraídos de Linfoma.	59
5.1	Resumen.	60
5.2	Marco teórico de la investigación.	61
5.3	Objetivo.	63
5.4	Materiales y métodos.	64
5.4.1	Procesamiento de la muestra.	64
5.4.2	Extracción de ADN y PCR anidada.	64
5.4.3	Amplificación del genoma completo de VLB.	65
5.4.4	Clonación y secuenciación de genomas completos de VLB.	68
5.4.5	Análisis Bioinformáticos.	70
5.5	Resultados y discusión.	71
5.5.1	Amplificación del genoma completo de VLB.	71
5.5.2	Análisis filogenético de cepas de VLB utilizando genomas completos	73
5.5.3	Análisis comparativo de la región 5' - LTR de secuencias de VLB de cepas aisladas a partir de diferentes orígenes y de linfomas.	76
5.5.4	Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales de cepas de VLB reportadas y cepas aisladas de linfomas.	80
5.5.5	Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas no estructurales de cepas de VLB aisladas de linfoma y otras disponibles.	90
5.6	Conclusiones.	96
6.	Capítulo 6: Expresión y purificación de la glicoproteína de superficie gp51.	98
6.1	Resumen.	99
6.2	Marco teórico de la investigación.	100
6.3	Objetivo.	103

6.4 Materiales y métodos.	104
6.4.1 Expresión de la proteína gp 51 de VLB en células de mamífero.	104
6.4.1.1 Construcción pSV2k-gp 51.	104
6.4.1.2 Mantenimiento de la línea celular murina X63.	104
6.4.1.3 Electroporación de células murinas X63 y clonación por dilución limite.	105
6.4.1.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.	105
6.4.1.5 Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue.	106
6.4.1.6 Western Blot.	106
6.4.2 Expresión y purificación de la proteína gp 51 de VLB en <i>E. coli</i> .	106
6.4.2.1 Construcción pET21 d-gp51.	106
6.4.2.2 Expresión de gp 51 recombinante.	107
6.4.2.3 Purificación de gp 51.	107
6.5 Resultados.	109
6.5.1 Expresión de la proteína gp 51 de VLB en células de mamífero.	109
6.5.1.1 Purificación y preparación de inserto gp 51 y vector pSV2k.	109
6.5.1.2 Clonación de gp 51 en pSV2k.	110
6.5.1.3 Clonación por dilución limite de células X63.	110
6.5.1.4 Verificación de clones positivos.	111
6.5.2 Expresión y purificación de la proteína gp 51 de VLB en <i>E. coli</i> .	112
6.5.2.1 Clonación de gp 51 en pET21 d.	112
6.5.2.2 Optimización de condiciones de expresión de gp 51 en BL21 (DE3)pLysS.	113
6.5.2.3 Purificación por IMAC de gp 51 recombinante obtenida de cuerpos de inclusión.	116
6.6 Discusión.	117
7. Capítulo 7: Diseño de librerías moleculares para el estudio de la dinámica de cuasiespecies de virus ARN	120
7.1 Resumen.	121
7.2 Marco teórico de la investigación.	122
7.3 Objetivos.	125
7.4 Materiales y métodos.	126
7.4.1 Transformación de células <i>E. coli</i> con el plásmido PV -1.	126
7.4.2 Extracción del ADN plasmídico por Lisis Alcalina.	126
7.4.3 Linealización del ADN plasmídico.	126
7.4.4 Purificación del ADN lineal correspondiente al genoma de PV.	127
7.4.5 Transcripción <i>In vitro</i> ADN lineal correspondiente al genoma de PV.	127
7.4.6 Electroporación de células HeLa S3 con ARN de PV transcripto <i>In vitro</i> .	127
7.4.7 Ensayo de plaqueo viral para Poliovirus en células HeLa S3.	128
7.4.8 Purificación de viriones de PV por colchón de sacarosa.	129
7.4.9 Ultracentrifugación.	129
7.4.10 Extracción y fragmentación de genomas de PV.	131
7.4.11 Purificación de ARN - Urea-PAGE.	131
7.4.12 Análisis por Bioanalyzer de fragmentos de ARN purificados.	131

---

7.4.13 Fosforilación y reparación de extremos por Polinucleótido quinasa (PNK).	132
7.4.14 Circularización de ARN.	132
7.4.15 Transcripción Reversa utilizando ARN circular como molde y ligación del ADNc.	133
7.4.16 PCR para la generación de librerías para análisis por secuenciado profundo utilizando Illumina.	133
7.4.17 Secuenciación convencional para verificación de la librería.	134
7.5 Resultados.	135
7.5.1 Purificación de viriones y genomas de PV.	135
7.5.2 Fragmentación de genomas de PV mediante la acción de cationes de Zn.	135
7.5.3 Purificación de fragmentos de ARN de tamaño específico a partir de geles Urea-PAGE.	138
7.5.4 Análisis de los fragmentos de ARN purificados.	139
7.5.5 Fosforilación y reparación de extremos por Polinucleotido quinasa (PNK).	140
7.5.6 Circularización de fragmentos de ARN.	140
7.5.7 Secuenciación convencional para verificación de la librería.	141
7.6 Discusión.	143
8. Conclusiones.	145
9. Anexo I: Soluciones.	149
10. Anexo II: Publicaciones derivadas de esta tesis.	152
11. Anexo III: Publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis.	162
12. Bibliografía	230