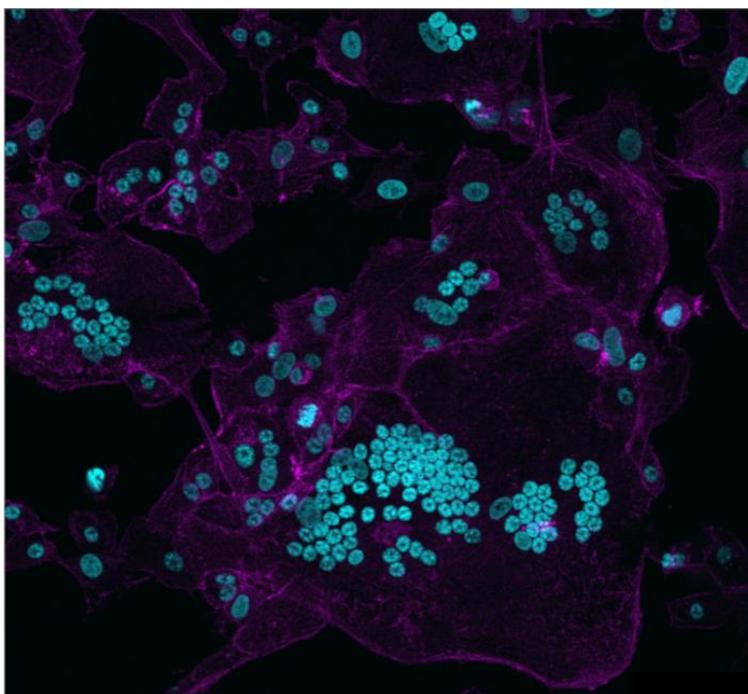


Tesis de Doctorado

Área: Biología

PEDECIBA

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INMUNÓGENOS CONTRA EL VIRUS DE LA LEUCEMIA BOVINA



MSc. Natalia Olivero

Director:
Dr. Otto Pritsch

Co-directores:
Dra. Mabel Berois
Dr. Marcelo Hill

Montevideo 2021

La imagen de la portada fue ganadora del 3^{er} Premio Tagaca “Mejor Imagen en Biociencias 2019”. Il Congreso Nacional de Biociencias, Montevideo 2019.

Título: “Acúmulos y nebulosas en el universo viral”

La glicoproteína de envoltura (Env) del virus de la leucemia bovina (VLB) juega un rol clave en la infectividad viral siendo responsable de la unión al receptor y la fusión de la membrana viral y de la célula blanco. Dicha capacidad fusogénica permite formar “sincicios” o células gigantes multinucleadas como consecuencia de la presencia de Env en la superficie de células blanco, ya sea por brotamiento (“from within”) durante la multiplicación viral o fusión (“from without”) de partículas virales. En esta imagen de microscopia confocal se observa un sincicio con más de 40 núcleos, resultado de la fusión entre células FLK productoras de VLB y células CC81 susceptibles a la infección por VLB. (magenta: citoesqueleto de actina; cian: núcleos).

RESUMEN

El Virus de la Leucemia Bovina (VLB) es un deltaretrovirus oncogénico que infecta linfocitos B en ganado bovino en todo el mundo y es el agente causante de la Leucosis Bovina Enzootica (LBE). En Uruguay, se estima que más del 70% del ganado lechero está infectado, causando importantes pérdidas económicas. Se han reportados varios trabajos intentando desarrollar inmunógenos que generen respuestas protectoras contra la infección por VLB, sin embargo, hasta el momento no existe ninguna vacuna que asegure una protección eficiente y/o disminución de la transmisión.

El objetivo general de esta tesis consistió en producir nuevos inmunógenos contra el VLB en el sistema de expresión eucariota basado en células S2 de *Drosophila melanogaster*. Para ello se planteó producir "Virus Like Particles" (VLPs) que contengan la proteína Gag en su interior y dos variantes de la glicoproteína Env de VLB en la superficie de la partícula: la proteína Env salvaje (Envwt) y un mutante en sitio furina (EnvFm). También se planteó analizar las propiedades inmunogénicas e inmunosupresoras del ectodominio de la proteína Env (ectoEnv o WT) y un mutante en el dominio de inmunosupresión (ectoEnvIm o MUT) en un modelo murino.

Generamos dos líneas celulares estables de S2 capaces de producir las VLP1 (formadas por Gag y Envwt) y las VLP2 (formadas por Gag y EnvFm). La expresión de las proteínas se confirmó mediante western blot, inmunofluorescencia y su antigenicidad fue evidenciada mediante el uso de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer epítopes lineales y conformacionales específicos presentes en las proteínas Env y Gag. La mutación del sitio de procesamiento proteolítico en la proteína EnvFm no alteró drásticamente ni su expresión y es expresada en la membrana de las células transfectadas. En cuanto a las VLPs purificadas, determinamos que la Envwt presente en las VLP1 es procesada correctamente por proteasas celulares tipo furina, mientras que la EnvFm presente en las VLP2, no es clivada por la furina quedando unidas gp51 y gp30 en forma covalente. Las Envs expresadas en las VLP1 y VLP2 se encuentran glicosiladas, pudiendo identificar mediante espectrometría de masa la presencia de dos residuos paucimanosídicos unidos al aminoácido N203. Por microscopía electrónica de transmisión (MET) logramos visualizar estructuras con forma y tamaño similares a VLPs brotando de las células transfectadas. Asimismo, también pudimos demostrar por MET la presencia de vesículas esféricas no agregadas y de tamaño variable similares a las descritas previamente para VLPs de otros retrovirus. La naturaleza polidispersa y no agregada de estas partículas extracelulares fue confirmada por dispersión dinámica de luz.

Por otra parte, generamos dos líneas estables capaces de expresar las proteínas Env WT y MUT, las cuales fueron purificadas con muy buenos rendimientos. Desde el punto de vista de la estructura oligomérica y la antigenicidad, ambas proteínas fueron comparables, por lo que las mutaciones introducidas en ISU, no parecían alterar la conformación de la proteína. Ambas proteínas mostraron ser inmunogénicas en el modelo murino. Respecto a la respuesta inmune humoral, ambas proteínas generaron una importante producción de anticuerpos IgG específicos determinados por ELISA. Sin embargo, la proteína WT generó un título mayor de anticuerpos respecto a la proteína MUT. En cuanto a la respuesta inmune celular generada frente a Env WT y MUT, hubo una tendencia a la proliferación de los linfocitos TCD8+ en aquellos esplenocitos derivados de la inmunización con la Env WT con respecto a los inmunizados con MUT. Por otro lado, el análisis de la expresión de citoquinas mostró de manera general un aumento de la expresión en los animales inmunizados con Env WT respecto a Env MUT. En particular pudo observarse un aumento

significativo en la producción IL17-A por aquellos esplenocitos derivados de la inmunización con Env WT respecto a los esplenocitos derivados de los ratones inmunizados con la proteína Env MUT.

Por último, se generó un sistema reportero para la infección por VLB, utilizando un sistema de lentivirus de segunda generación, el cual fue evaluado mediante el co-cultivo con una línea celular persistentemente infectada con VLB. Esta herramienta podrá ser utilizada para evaluar capacidad infectiva de muestras biológicas y procesos de inactivación de las mismas, así como también evaluación de compuestos con capacidad anti-viral.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, intentamos contribuir al conocimiento en el desarrollo de una vacuna contra el VLB, mediante la generación de distintos inmunógenos. Por primera vez, y utilizando el sistema de expresión de células S2 de *Drosophila*, se generaron VLPs de VLB formadas por las dos proteínas más inmunogénicas de VLB, Env y Gag. Estas VLPs diseñadas racionalmente podrían ser un inmunógeno adecuado para ser utilizado: en la caracterización de la respuesta inmune generada por este virus; y para el desarrollo de vacunas. Expresamos y caracterizamos el ectodominio de la glicoproteína Env wt y con mutaciones en el ISU, siendo ambas proteínas inmunogénicas en el modelo murino. Estudios *in vivo* en bovinos son necesarios para realizar análisis exhaustivo de la respuesta inmune humoral y celular frente a estos inmunógenos. Así como también determinar el rol del dominio de inmunosupresión en la modulación de dichas respuestas.

Los inmunógenos generados en esta tesis son una nueva herramienta que junto con otros procedimientos podrían contribuir a una disminución de la transmisión global y un descenso en la prevalencia de VLB.

1 TABLA DE CONTENIDO

Resumen	1
2	Abreviaturas.....7
3	Introducción.....8
3.1	Virus de la Leucemia Bovina 8
3.1.1	Clasificación taxonómica..... 8
3.1.2	Morfología y ciclo replicativo..... 10
3.1.2.1	Morfología del VLB..... 10
3.1.2.2	Ciclo replicativo del VLB..... 12
3.1.2.3	Proteína Env 15
3.1.2.3.1	Determinantes antigénicos en gp51 y gp30 17
3.1.2.3.2	Rol de la N-glicosilación en gp51 18
3.1.2.3.3	Dominio de inmunosupresión 19
3.1.2.3.4	Región citoplasmática de la proteína Env..... 21
3.1.2.4	Proteína Gag 21
3.2	Leucosis Bovina Enzoótica 22
3.2.1	Patogenesis y mecanismo molecular de la infección 22
3.2.2	Respuesta inmune frente a VLB..... 29
3.2.3	Mecanismos de transmisión Viral..... 29
3.2.4	Prevalencia de la LBE 31
3.3	Estrategias de control y prevención de la LBE 32
3.4	Vacunas..... 33
3.5	Problema identificado..... 40
4	Objetivos de la tesis..... 42
5	Estrategia experimental..... 43
6	Materiales y métodos 46
6.1	Diseño y construcción de plásmidos..... 46
6.1.1	Optimización de codones del fragmento TMCTD del gen env (cepa FLK-VLB)..... 47
6.1.2	Diseño de primers..... 48
6.1.3	RF-cloning 48
6.1.4	Mutagénesis dirigida..... 49
6.1.5	Purificación de plásmidos y confirmación de secuencia 49
6.2	Generación de líneas estables de S2 50
6.2.1	Transfección de células S2 con Effectene 50
6.3	Caracterización de la línea estable S2 productora de VLPs 51

6.3.1	Cinética de inducción	51
6.3.2	Inmunofluorescencia indirecta en células S2 transfectadas	51
6.3.3	Citometría de flujo	51
6.4	Producción y caracterización de VLPs.....	52
6.4.1	Producción y purificación de VLPs	52
6.4.2	SDS-PAGE/WB	52
6.4.3	Microscopía electrónica de transmisión.....	52
6.4.4	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	53
6.4.5	Espectrometría de masa (ms)	53
6.5	Expresión y caracterización de las proteínas ectoEnv y ectoEnvIm	54
6.5.1	Cinética de inducción.....	54
6.5.2	Producción de las proteínas ectoEnv y ectoEnvIm	54
6.5.3	Purificación de ectoEnvFm y ectoEnvFmIm por cromatografía de afinidad	55
6.5.4	Caracterización de las glicoproteínas solubles	55
6.5.4.1	Cromatografía de exclusión molecular (SEC)	55
6.5.4.2	Sds-page/coomassie	55
6.5.4.3	espectrometría de masa	55
6.6	Análisis de la respuesta inmune frente a ectoEnvFm y ectoEnvFmIm	56
6.6.1	Inmunización de ratones BALB/c	56
6.6.2	Análisis de la respuesta humoral	56
6.6.2.1	Determinación del título de anticuerpos.....	56
6.6.2.2	Determinación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos obtenidos	57
6.6.2.2.1	Formación de sincicios mediante co-cultivo de FLK y CC81	57
6.6.2.2.2	Observación de sincicios mediante tinción con Giemsa	57
6.6.2.2.3	Observación de sincicios mediante Microscopía confocal	57
6.6.2.2.4	Observación de la formación de sincicios in vivo-Time lapse.....	57
6.6.2.2.5	Inhibición de la formación de sincicios.....	58
6.6.3	Estudio de la respuesta inmune celular	58
6.6.3.1	Ensayo de PROLIFERACIÓN EX vivo de CÉLULAS T.....	58
6.6.3.2	Evaluación de la producción de citoquinas.....	59
6.7	Generación de una línea reportera de la infección por VLB.....	59
6.7.1	Infección de células Vero y CC81 con VLB	59
6.7.2	Extracción de ADN genómico de células infectadas.....	59
6.7.3	PCR de ADN proviral	60
6.7.4	Expresión de proteínas virales en células Vero infectadas.....	60
6.7.5	Plásmidos Lentivirales de Segunda Generación	60

6.7.6	Transfección de células HEK293T para la obtención de pseudovirus lentivirales	63
6.7.7	Transducción de células Vero y CC81 con PVs LTRVLBGFP, para la generación de la línea reportera ⁶³	
6.7.8	Evaluación de la línea reportera mediante la infección con VLB.....	64
6.8	Líneas celulares.....	65
7	Resultados y discusión.....	67
7.1	Producción y caracterización de VLPs de VLB.....	67
7.1.1	Expresión de las proteínas Envwt, EnvFm y Gag en células S2 de <i>Drosophila</i>	67
7.1.2	Incorporación de Gag y Env en VLPs.....	70
7.1.3	Identificación de Gag y EnvFm por espectrometría de masa	72
7.1.4	Morfología y tamaño de las VLPs.....	75
7.1.5	Propiedades Antigénicas de las VLPs.....	77
7.2	Análisis de las propiedades inmunogénicas e inmunosupresoras de la proteína recombinante ectoEnv de VLB	83
7.2.1	Expresión de las proteínas ectoEnv y ectoEnvIm en células S2 de <i>Drosophila</i>	83
7.2.2	Purificación y caracterización de las proteínas ectoEnv y ectoEnvIm	85
7.2.3	Análisis de la respuesta inmune	88
7.2.3.1	Respuesta inmune humoral.....	88
7.2.3.1.1	Determinación del título de anticuerpos IgG totales específicos anti-ectoEnv	88
7.2.3.1.2	Determinación de la capacidad neutralizante.....	89
7.2.3.2	Respuesta inmune celular.....	96
7.2.3.2.1	Análisis de la proliferación de células T.....	96
7.2.3.2.2	Análisis de la producción de citoquinas.....	96
7.3	Generación de un sistema reportero para la infección por VLB.....	104
7.3.1	Infección con VLB.....	106
7.3.2	Retrotranscripción e integración del genoma del VLB al genoma de las células Vero o CC81.	111
7.3.3	Localización de Env y Gag en células Vero infectadas	113
7.3.4	Generación de líneas celulares reporteras de la infección por VLB	115
7.3.5	Co-cultivo de las líneas reporteras con la línea FLK.....	118
8	Conclusiones por Objetivo Específico	123
9	Conclusion Final	127
10	Perspectivas	128
11	Bibliografía	132
12	Anexo I. Material Suplementario – Materiales y Métodos.....	149
12.1	Secuencia de primers.....	149
12.1.1	Primers para clonar Gag en (FLK-VLB) en pT350	149

12.1.2	Primers para clonar el fragmento TMCTD optimizado	149
12.1.3	Primers para la mutagénesis del péptido ISU	149
12.1.4	Secuencia de primers para PCR	150
13	Anexo II. Material suplementario – Resultados.....	151
13.1	Diseño y construcción de plásmidos. Confirmación de Secuencia.....	151
13.2	Expresión, producción y caracterización de VLPs.....	160
13.2.1	Caracterización de líneas estables productoras de VLPs.....	160
13.2.1.1	Extracción de ADN de células transfectadas/PCR Env y Gag	160
13.2.2	Producción y caracterización de VLPs.....	161
13.2.2.1	Identificación de Gag y EnvFm por espectrometría de masa	162
13.2.2.2	Morfología de las VLPs.....	163
13.3	Análisis de la respuesta inmune	168
13.3.1	Análisis de citoquinas.....	168
13.4	Generación de línea reportera para la infección por VLB	171
14	Anexo II. Publicaciones	175

2 ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico	IN: integrasa	pM: promotor de metalotioneína
AL: aleucémico	INF: interferón	Pol: polimerasa
ARN: ácido ribonucleico	IS: inhibición de sincicios	PR: proteasa
BSA: seroalbúmina bovina	ISU: dominio de inmunosupresión	RBD: dominio de unión al receptor
CA: cápside	ITAM: inmunorreceptor basado en tirosina	RE: retículo endoplásmico
CTL: linfocitos T citotóxicos	kDa: kilodaltons	SFB: suero fetal bovino
DLS: dispersión dinámica de la luz	LBE: leucosis bovina enzoótica	TA: temperatura ambiente
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	LF: linfosarcoma	TNF: factor de necrosis tumoral
EK: enteroquinasa	LP: linfocitosis persistente	µg: microgramos
ELISA: enzyme-linked Immunosorbent Assay	LTR: repetidos largos terminales	µL: microlitros
Env: proteína Env (gp51-gp30)	MA: matriz	VLB: virus de la Leucemia Bovina
EnvFm: proteína Env con el sitio furina mutado	MET: microscopia electrónica de transmisión	VLP: virus like particle
EnvFmIm: proteína Env con el sitio furina e ISU mutado	MHC: complejo mayor de histocompatibilidad	VSV: virus de la estomatitis vesicular
Gag: group associated antigen	mL: mililitros	VVR: virus vaccinia recombinante
gp30, TM: glicoproteína transmembrana, de fusión	MSD: dominio de anclaje a membrana	WB: western blot
gp51, SU: glicoproteína de superficie, de unión al receptor	NK: células natural killers	wt: wild type
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana	nm: nanómetros	dpi: días post infección
HTLV: virus linfotrópico de células T humano	ON: over night	hpi: horas post infección
IL-: interleuquina	PBMCs: células mononucleares de sangre periférica	PBS: buffer fosfato salino

3 INTRODUCCIÓN

Los primeros reportes y descripciones clínicas de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) se remontan a finales del siglo XIX en Alemania y la actual Lituania, caracterizada por la presencia de nódulos amarillentos en el bazo agrandado de bovinos. Sin embargo, la naturaleza infecciosa de esta enfermedad fue planteada varias decenas de años después basadas en datos epidemiológicos. Finalmente, el agente etiológico de esta enfermedad fue aislado en cultivos en el año 1969 y designado como Virus de la Leucemia Bovina (VLB) [1]. La LBE se caracteriza por una incubación prolongada, un curso crónico y muchas veces subclínico. La mayoría de los animales infectados por el VLB (50 al 70%) son portadores asintomáticos del virus, no presentan ni clínica ni alteración en el recuento linfocitario, y solamente pueden ser identificados por la presencia de anticuerpos anti-VLB y/o ADN proviral. De un 30 a 50% de los animales infectados desarrollan una proliferación policlonal benigna de células B denominada linfocitosis persistente (LP). Más allá de estas manifestaciones, estos animales no presentan otras alteraciones destacables y la LP usualmente es estable por largos períodos de tiempo [2–4]. Sin embargo, esta expansión pre-neoplásica de células B predispone a cambios celulares secundarios que pueden desembocar en la transformación maligna del linfocito, dando origen a la manifestación clínica más evidente y grave de la enfermedad: el desarrollo de tumores linfoides. Estos linfosarcomas (LS) ocurren en una minoría de los animales infectados por VLB (5 a 10%) [2]. Más allá de los claros riesgos para la vida del animal que conlleva el desarrollo de estos tumores, es de destacar también que la infección por el VLB produce una inmunosupresión que facilita el desarrollo de infecciones oportunistas entre otras consecuencias [3].

3.1 VIRUS DE LA LEUCEMIA BOVINA

3.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El VLB, agente etiológico de la LBE pertenece a la familia *Retroviridae* y forma parte del género *Deltaretrovirus* junto a otros virus que causan leucemia en células T tanto en humanos (HTLV-1, HTLV-2 y HTLV-3) como en simios (STLV-1, STLV-2 y STLV-3) [5], [1](Figura 1). A nivel general los Deltaretrovirus son virus oncogénicos que exhiben linfotropismo *in vivo* y son capaces de causar la transformación maligna de la célula que infecta. En el caso del VLB, la principal célula blanco es el linfocito B, produciéndose la integración persistente del ADN viral al genoma celular, induciendo una infección mantenida que puede presentar una evolución clínica variada [6]. Mientras que el VLB causa la antes mencionada LBE, el HTLV-1 causa diversas patologías como leucemia a células T del adulto (ATL por “adult T-cell leukemia/lymphoma”), desórdenes inflamatorios como la paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada al virus HTLV-I (TSP/HAM por “tropical spastic paraparesis or HTLV-I-associated myelopathy”) y uveítis, afecciones dermatológicas y otras afecciones (algunas asociadas a infecciones oportunistas) [7].

En simios STLV-1 causa una enfermedad linfoproliferativa con sintomatología similar a la observada en humanos infectados con HTLV-1 [8].

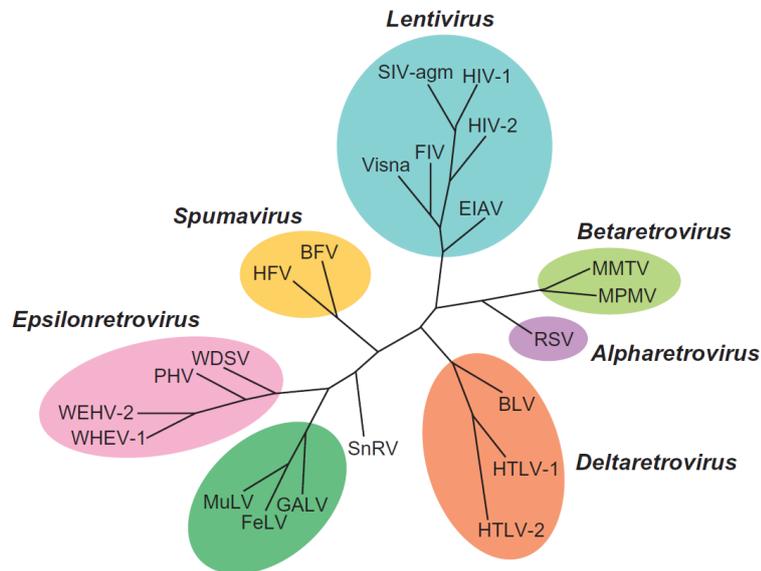


Figura 1. Análisis filogenético de retrovirus.

El análisis filogenético se llevó a cabo a partir de secuencias del gen *pol* de diversos retrovirus. Figura extraída de [9].

La estabilidad genética descrita previamente para el VLB se asociaba al hecho de que el ADN proviral se replica principalmente mediante la división mitótica de las células B infectadas, con una participación menor de la retrotranscriptasa reversa. Sin embargo, análisis filogenéticos centrados en la amplificación de un segmento de 444 pb del gen *env* mostraron una variabilidad genética suficiente para diferenciar 11 genotipos de VLB en diferentes regiones del mundo, siendo el genotipo 1 el más predominante en todo el mundo [10–17]. En nuestro país, un análisis filogenético a partir de la secuencia del gen realizado en nuestro laboratorio por Moratorio et al., permitió determinar la presencia del genotipo 1 en nuestro país [18]. Polat et al., mediante el análisis filogenético utilizando secuencias de genomas completos de VLB, determinó con éxito la existencia de los genotipos 1, 2, 4, 6, 9 y 10, entre 10 de los genotipos de descritos previamente. Así mismo demostró que cada uno de los genotipos presenta sustituciones aminoacídicas específicas tanto en regiones conteniendo genes estructurales y no estructurales [11], [19].

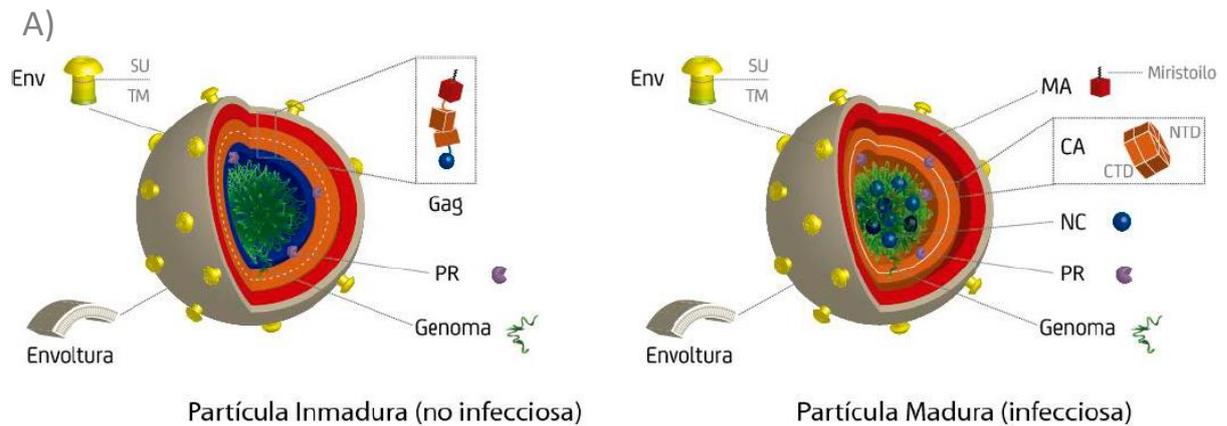
3.1.2 MORFOLOGÍA Y CICLO REPLICATIVO

3.1.2.1 MORFOLOGÍA DEL VLB

La **partícula de VLB** tiene una morfología esférica con un diámetro de entre 80 y 120 nm y posee una envoltura lipídica (**Figura 2**) en la cual se encuentran embebidas un número variable de glicoproteínas de superficie agrupadas en forma de trímeros [20], [21]. Para otros retrovirus como HIV o SIV el número de trímeros se ha estimado entre 8-14 trímeros por partícula, lo cual representa un número excepcionalmente bajo en comparación con otros virus, reduciendo la eficiencia de transmisión pero también la capacidad de desplegar una respuesta de anticuerpos neutralizantes eficiente [22, 23].

La cara interior de la envoltura viral de una partícula madura se encuentra recubierta por la proteína matriz (MA), uno de los productos de la proteólisis de Gag a cargo de la proteasa viral (PR) (**Figura 2**). La proteína MA se ancla a la cara interna de la membrana plasmática de la célula gracias a la adición co-traduccional de un grupo miristoílo en el extremo N-terminal. En el interior de la partícula madura encontramos el núcleo viral o “core”, conformado por la cápside (CA) conteniendo al genoma viral y el resto de los componentes virales. La cápside retroviral es una estructura supramolecular cerrada y pleomórfica, formada exclusivamente por subunidades CA (otro de los productos proteolíticos de Gag) mayoritariamente dispuestas en arreglos cuasi-hexagonales semi-planares, con suficiente curvatura para formar una estructura cerrada tipo fullereno [24]. Esto es geoméricamente posible gracias a la introducción de doce arreglos pentaméricos de CA con ubicación variable, lo cual resulta en cápsides con estructuras muy diversas [25], [26] en contraposición con las cápsides icosaédricas de otros virus (con forma y dimensiones definidas). Estas unidades hexaméricas y pentaméricas representan los capsómeros de los retrovirus.

En cuanto al **genoma del VLB**, el mismo está formado por dos copias idénticas de ARN simple hebra de polaridad positiva lineal y no segmentado, con alrededor de 8700 nucleótidos [20]. El ARN viral es generado por la maquinaria transcripcional de la célula hospedera y por ende contiene elementos propios de los ARNm en los extremos 5' y 3' (**Figura 3**). La región codificante consta de tres genes principales: **gag** (group specific antigen), **pol** (polymerase) y **env** (envelope) además de genes reguladores codificados por la región X. En ambos extremos de la región codificantes se encuentran los LTRs (long terminal repeats).



B)

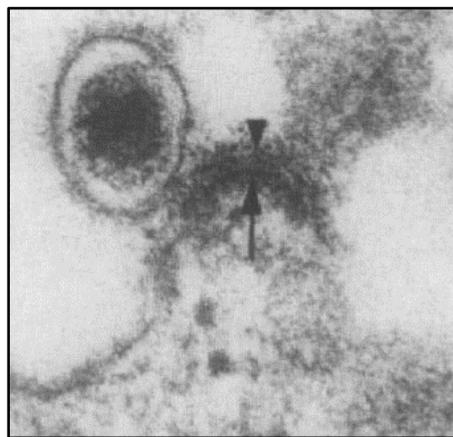


Figura 2. Partícula viral de VLB.

(A) Esquema de una partícula viral de VLB con la envoltura viral proveniente de la bicapa lipídica de la célula hospedera, presentando en la superficie los trómeros de Env (amarillo) responsables de la unión al receptor celular y de la fusión de la partícula con la célula. A la *izquierda*, se presenta una partícula inmadura con Gag (en rojo, naranja y azul para distinguir sus dominios MA, CA y NC) tapizando la cara interna del virión y el genoma formado por 2 copias de ARN simple hebra ubicado en el centro (verde). La proteasa viral PR (violeta) es la encargada de clivar la poliproteína Gag durante el proceso de maduración para dar origen a las proteínas estructurales. A la *derecha*, se representa la partícula viral madura con Gag clivada. Tapizando la cara interna de la envoltura se encuentra MA, y CA formando la cápside cerrada. NC se representa ahora como esferas azules interactuando directamente con el genoma condensado en el interior del virión. (B) Microscopía electrónica de una partícula de VLB junto a una partícula en proceso de ensamblado y brotamiento (flechas negras) obtenidas a partir de linfocitos de una vaca presentando linfocitosis persistente [21].

Dentro de los LTR se encuentran las secuencias cortas repetidas **R** (repeated region) y las regiones **U5** y **U3** (unique 5' y unique 3' regions), las cuales presentan diferencias características entre sí, pero comparten las secuencias att necesarias para la integración proviral; U3 posee además elementos actuantes en *cis*, implicados en la expresión de los genes virales. Entre U5 y la región codificante se encuentran el sitio de unión al cebador **pbs** (primer binding site) donde inicia la síntesis de la cadena de ADN negativo durante la retrotranscripción y la secuencia **psi** (Ψ) responsable de la encapsidación del

ARN viral. A continuación de la región codificante y justo antes de U3 se encuentra una corta secuencia de polipurinas **ppt** (polypurine tract) [27].

El **gen gag** codifica la poliproteína estructural Gag precursora de las proteínas MA, CA y nucleocápside (NC), mientras que el gen *pol* codifica otra poliproteína precursora de las enzimas replicativas esenciales: transcriptasa reversa (RT) e integrasa (IN) así como la PR responsable del procesamiento de Gag y Pol. El **gen env** da lugar a la glicoproteína Env, una poliproteína que es clivada por una proteasa celular tipo furina para dar lugar a las subunidades de superficie (SU o gp51) y transmembrana (TM o gp30) responsables de mediar la unión al receptor celular y fusionar la envoltura viral con la membrana plasmática celular. En cuanto a las proteínas codificadas por **la región reguladora X**, Tax está implicada en la replicación viral y los procesos de oncogénesis, y Rex controla el transporte nuclear y la traducción de los ARN virales, mientras que R3 y G4 están relacionados con los procesos patogénicos [28], [27]. Además un conjunto de tres ARN antisentido (codificados por la cadena de ADN proviral positivo) han sido identificados recientemente, homólogos a los que codifican HBZ en HTLV-1, una proteína relacionados con el proceso leucemogénico [29].

3.1.2.2 CICLO REPLICATIVO DEL VLB

El **ciclo replicativo** comienza con la interacción de las glicoproteínas Env presentes en la envoltura viral y el receptor celular (**Figura 4**). En particular la subunidad gp51 es quien media la interacción con el receptor celular desencadenando un arreglo conformacional de gp30 que libera el péptido de fusión que se ancla en la membrana celular, acercando y fusionando ambas bicapas lipídicas (viral y celular). Recientemente Yoko Aida et al., reportaron al transportador 1 de aminoácido catiónicos (CAT-1), como el receptor celular de VLB [30]. Luego de la fusión de las membranas ocurre el desnudamiento, en donde la cápside conteniendo el genoma viral es liberada al citoplasma dando lugar a la **retrotranscripción del ARN** en ADN formando el complejo de preintegración (PIC) el cual es importado posteriormente al núcleo del linfocito B. Una vez allí se integra por acción de la **integrasa** y queda constituido como provirus. Si bien durante bastante tiempo se pensó que la integración del VLB ocurría en forma aleatoria, motivo por el cual no existía relación alguna entre el proceso de integración y los mecanismos oncogénicos; recientemente se han encontrado sitios de integración preferencial o “*hotspots*” que podrían implicar la alteración de genes relacionados con cáncer o “*cancer drivers*” [31, 32].

El provirus forma parte del genoma celular siendo por tanto estable y puede **transcribirse** gracias a la maquinaria de la célula hospedera (ARN polimerasa II) dando lugar por un lado a ARN mensajeros virales que permiten la síntesis de distintas proteínas estructurales y reguladoras y también generando ARN genómicos necesarios para la formación de nuevas partículas virales.

Luego de traducidas las proteínas virales, las citoplasmáticas permanecerán en este compartimiento mientras que la glicoproteína Env (precursor proteico) seguirá la ruta del RE-aparato de Golgi para la posterior oligomerización, glicosilación y exportación de la proteína a la membrana plasmática de la célula infectada. Finalmente, el **ensamblaje** de la partícula viral tiene lugar en zonas particulares de la membrana plasmática que contienen la Env (microdominios ricos en lípidos requeridos para reclutar componentes virales) donde las 2 copias de ARN genómico se asocian a las proteínas enzimáticas junto con las proteínas estructurales Gag dando lugar a la formación de las partículas virales.

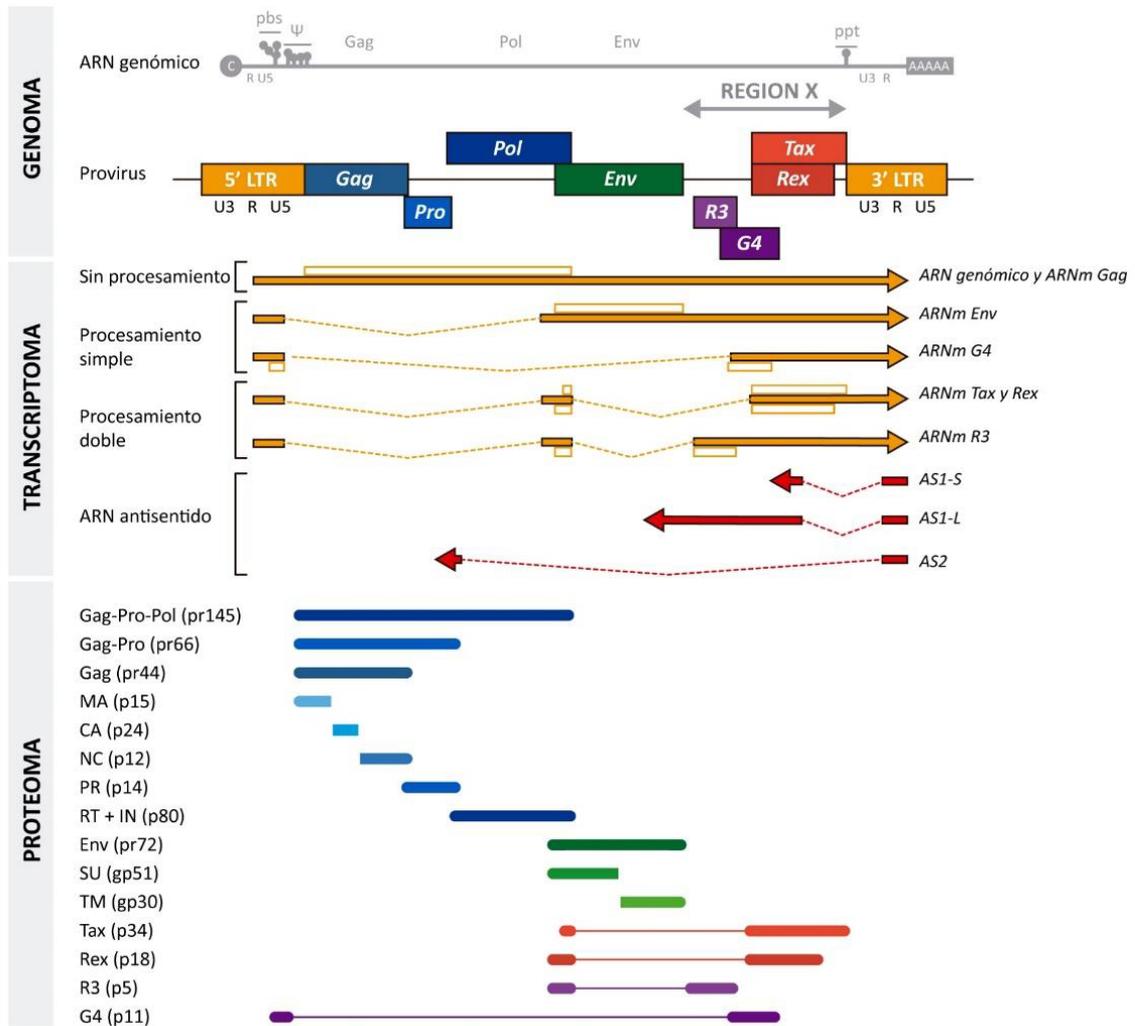


Figura 3. Genoma de VLB y sus productos de transcripción y traducción.

Se representa el genoma de VLB con sus elementos característicos y los genes que codifica. Se incluyen los diferentes ARNs transcritos (flechas anaranjadas) con sus respectivas regiones codificantes o CDS (rectángulos sin relleno del mismo color) y los intrones eliminados por eventos de splicing (líneas discontinuas). Por último, se presentan las diferentes proteínas traducidas, incluyendo precursores y los respectivos productos de proteólisis que dan lugar a proteínas funcionales. Aquellas proteínas cuyas secuencias codificantes (CDS) integran dos exones diferentes se presentan como bloques unidos por una línea delgada del mismo color (representando la región intrónica). Adaptado de [20, 29, 33].

El brotamiento tiene lugar en sitios discretos de la membrana plasmática (lipid rafts) y en este proceso se reclutan mediante los llamados dominios tardíos (presentes en MA motivo PPPY) la maquinaria celular ESCRT (del inglés “endosomal sorting complex required for transport”) que asisten al brotamiento y liberación de las partículas virales inmaduras [34].

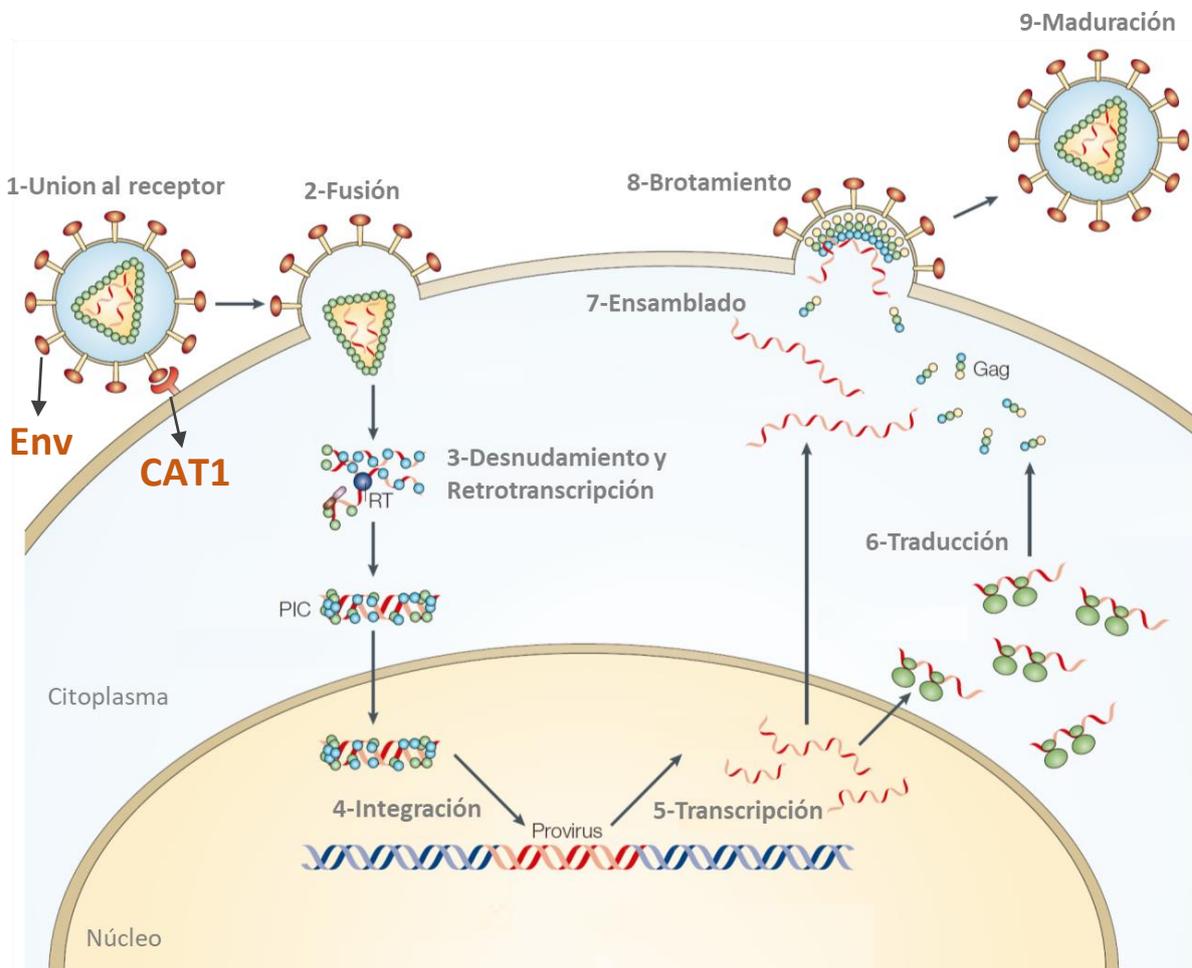


Figura 4. Ciclo replicativo de retrovirus.

Se esquematizan los procesos de unión al receptor, entrada, retrotranscripción, integración, síntesis de proteínas, ensamblaje y liberación de nuevas partículas virales las cuales maduran fuera de la célula hospedera. Adaptado de Nisole et al. [35].

La liberación de la partícula viral da lugar a la activación de la proteasa la cual procesa tanto Gag como Gag-pro-pol dando lugar a las proteínas individuales. Esto dispara el paso principal de maduración de la partícula viral en la cual Gag sufre procesamiento proteolítico (desensamblándose) y dando lugar a las proteínas estructurales. La partícula viral de VLB con Gag completamente clivada es la forma madura del virión y por consiguiente posee capacidad infectiva [27].

3.1.2.3 PROTEÍNA ENV

La proteína Env de VLB se sintetiza como un precursor poliproteico glicosilado inactivo (gp72) de 515 aminoácidos (aa) cuyo extremo N-terminal es generado por la pérdida del péptido señal en el RE de la célula hospedera (**Figura 5**). En este compartimiento este precursor se oligomeriza formando homotrímeros y posteriormente durante el transporte de la proteína a la superficie (cada monómero) es procesado proteolíticamente por convertasas celulares tipo furina dando lugar a las subunidades, gp51 y gp30. Ambas subunidades están unidas por puentes disulfuro y permanecen asociadas como un trímero funcional (gp51/gp30)₃ [36–39].

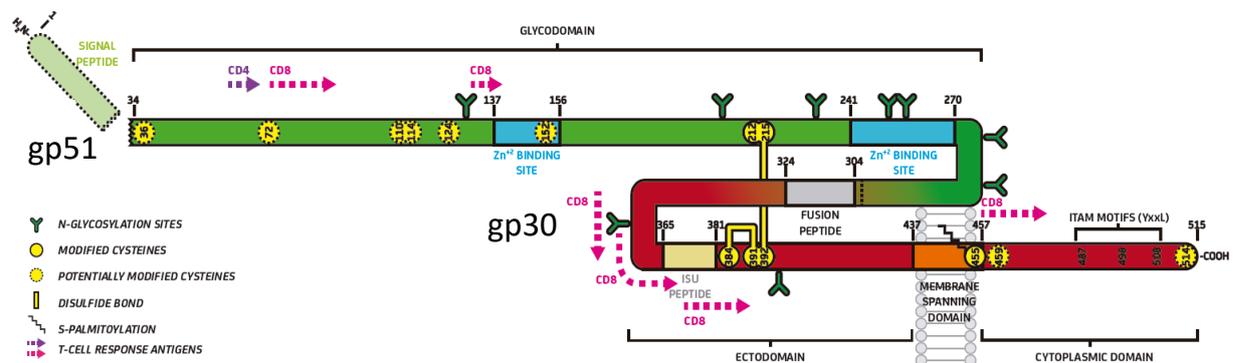


Figura 5. Proteína Env de VLB.

En esta representación de la proteína Env, se muestra el péptido señal (1-33 aa), la subunidad gp51 (34-301 aa) que se une al receptor, el sitio de procesamiento proteolítico (301-302 aa) y la subunidad gp30 (302-515 aa). Se señala también, los sitios de N-glicosilación, las cisteínas modificadas, el enlace disulfuro intersubunidad, y epítopes T CD4+ y CD8+.

El procesamiento proteolítico es necesario para que la proteína adquiera su potencial fusogénico, de esta manera los trímeros gp51/gp30 adquieren una conformación metaestable que posee la energía necesaria para llevar a cabo el proceso de fusión. La interacción del dominio de unión al receptor (RBD) presente en gp51 con el receptor celular dispara un cambio conformacional en este complejo generando un rearrreglo en la subunidad gp30 que hace que el péptido de fusión presente en la porción N-terminal de gp30 quede expuesto [40]. Este péptido hidrofóbico se inserta entonces en la membrana celular durante una conformación extendida (“pre-horquilla”), intermedia que adquiere la proteína. Finalmente, en la conformación post-fusión gp30 se repliega en una conformación de horquilla en la cual el extremo N-terminal (conteniendo el péptido de fusión) es traído contra el extremo C-terminal con el dominio de anclaje a membrana (MSD). Este cambio conformacional de gp30 genera que ambas membranas viral y celular entren en aposición constituyendo el primer paso en la fusión de membranas (**Figura 6**) [41].

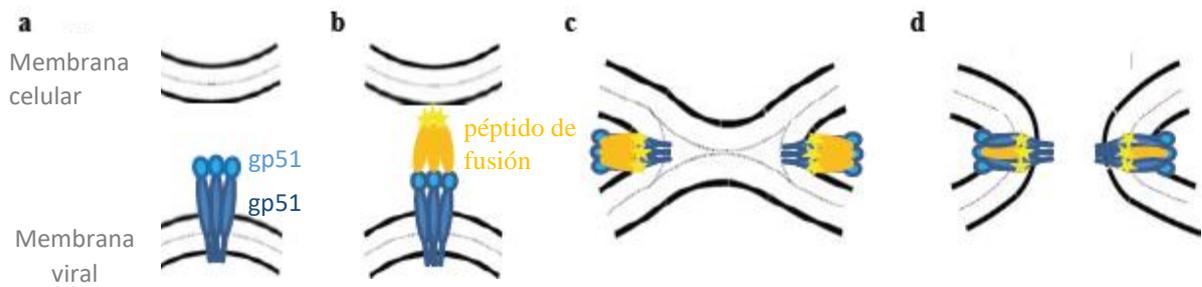


Figura 6. Modelo de fusión para la proteína Env de VLB.

a) Trímero de Env en un estado de fusión incompetente; b) luego de la unión al receptor, un cambio conformacional expone el péptido de fusión hacia la membrana celular; c) la inserción del péptido de fusión en la membrana lipídica media la formación de un diafragma de hemifusión y la fusión de ambas membranas; (d) Estructura de fusión después del replegamiento. En este estado, el péptido de fusión y la gp30 se anclan a la membrana en una conformación antiparalela. Modelo de fusión adaptado del virus de la leucemia murina. Adaptado de De Brogniez et al., [41].

El cambio conformacional que ocurre en gp30 tiene lugar una vez que ocurre la unión al receptor en la superficie de la célula e involucra la isomerización del puente disulfuro presente entre gp51 y gp30 (**Figura 7**). Los retrovirus cuyas subunidades permanecen unidas por puentes disulfuro son los α , γ y δ -retrovirus mientras que los β -retrovirus al igual que los lentivirus (como HIV-1) permanecen unidos por enlaces no covalentes. Este puente disulfuro estabiliza la asociación entre ambas subunidades. Esto posiblemente ayude a evitar una activación prematura de la subunidad gp30 fuera de la célula blanco pero también compromete la activación dentro de la célula blanco. La secuencia $C^{212}XXC^{215}$ en gp51 participa en la formación del puente disulfuro intersubunidad. El modelo indica que la C^{215} está unida por puente disulfuro a gp30 mientras que C^{212} lleva un grupo tiol libre que puede inducir isomerización del enlace gp51-gp30 en un CXXC-disulfuro con la subsecuente activación de la fusión. En la Env inactiva, el puente disulfuro se establece entre C^{215} y el último residuo del motivo CX_6CC ubicado en gp30, en el caso de VLB la C^{392} . Luego de la unión de gp51 al receptor celular (activación), el tiol presente en C^{212} se desprotona de modo que puede atacar el puente disulfuro intersubunidad y rearregla en un isómero disulfuro dentro del motivo (CXXC) para dar lugar a dos puentes disulfuro intrasubunidad (**Figura 7**) [42–44].

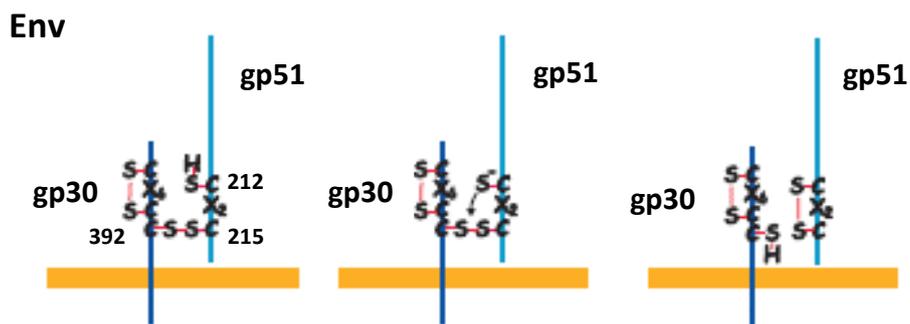


Figura 7. Modelo de activación del enlace disulfuro intersubunidad presente en Env.

La unión de gp51 al receptor desencadena el proceso de isomerización del puente disulfuro intersubunidad presente entre la Cys215 en gp51 y la Cys392 en gp30. La Cys212 reactiva con un tiol libre induce la isomerización del enlace gp51-gp30 en dos puentes disulfuro intrasubunidad. Adaptado de Li et al., [42].

3.1.2.3.1 Determinantes antigénicos en gp51 y gp30

La subunidad gp51 es el principal blanco de la respuesta inmune antiviral, como lo indica la rápida emergencia de anticuerpos neutralizantes luego de la infección viral. En gp51 se encuentran al menos 8 sitios antigénicos, llamados de la A a la H, de los cuales 3 corresponden a epítopes conformacionales y neutralizantes. Los anticuerpos monoclonales contra el epítope H son capaces de inhibir completamente la fusión en cultivos celulares. Anticuerpos monoclonales que reconocen los epítopes F y G, reducen en menor medida la capacidad de formar sincicios. De todas las cepas de VLB conocidas, la pérdida simultánea de estos tres epítopes (F, G y H) nunca ha sido reportada lo que sugiere la importancia de estos en el ciclo viral. Además de la respuesta inmune humoral, gp51 es capaz de estimular la respuesta de células T, como lo indica la presencia de epítopes CD4+ y CD8+ (**Figura 8**) [41], [45].

Por otro lado, respecto a **la subunidad gp30** en un trabajo realizado por Bai et al., se identificaron epítopes CTL en gp30 indicando una fuerte respuesta inmune celular hacia esta proteína. Estos epítopes, resultaron ser menos pleomórficos respecto a los epítopes presentes en gp51 [46]. En este sentido, hacen mención de que uno de los mayores problemas en usar gp51 como inmunógeno es la variabilidad de los epítopes CTL. Por lo que el mejor candidato a inmunógeno debería contener epítopes presentes en gp51, así como también los presentes en gp30 [46].

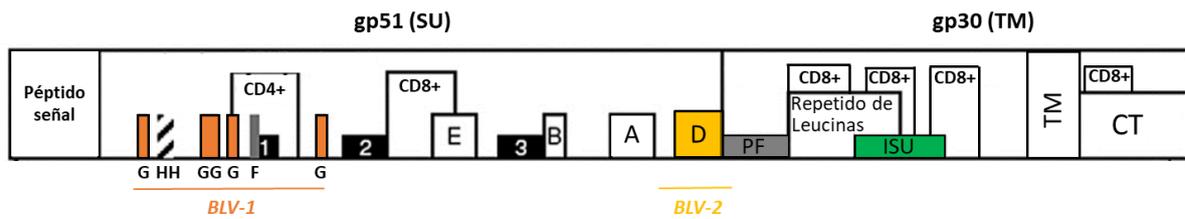


Figura 8. Representación de las subunidades gp51 y gp30.

En la subunidad gp51 se representan los epítopes conformacionales y lineales (A-H), los sitios antigénicos de neutralización (recuadros negros 1,2 y 3), los epítopes CD4+ (aá 61-70) y CD8+ (73-92 y 131-140). Se muestran los epítopes reconocidos por los anticuerpos monoclonales BLV-1 y BLV-2 (VMRD, USA). En la subunidad gp30, se representa el péptido de fusión (PF); el dominio de inmunosupresión (ISU); región transmembrana (TM); la región citoplasmática (CT); epítopes CD8+ (aá 40-59, 70-89, 150-169). Adaptado de Zhao et al., [45] y De Brogniez et al., [41]

3.1.2.3.2 Rol de la N-glicosilación en gp51

La glicosilación en las proteínas de envoltura retrovirales, juegan un rol sumamente importante dado que el perfil de glicosilación se relaciona con su función en la penetración viral y en su capacidad inmunogénica, por lo que es importante tanto para el diagnóstico como para eventuales estrategias de vacunación [41]. Al igual que en el resto de las proteínas Env de otros retrovirus, la mayor contribución de glicanos se produce por N-glicosilación. La gp51 de VLB tiene 8 sitios de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr, X: cualquier aa excepto Pro) (Figura 5), representando el core glúcido un 40% del peso total de la proteína (21 kDa). En un trabajo realizado por De Brogniez et al., en el cual realizaron la mutación simultánea de los 8 sitios de N-glicosilación, observaron que la infectividad *in vivo* era completamente anulada, demostrando la importancia en la persistencia o replicación viral. Por el contrario, mutaciones únicas de los sitios de glicosilación, mostraron no afectar la infectividad, excepto una en la asparagina N230. Esta mutación en N230 estabilizó la proteína gp51 y aumentó la infección de célula a célula *in vitro* [47].

En HIV, la subunidad gp120 (análoga a gp51 de VLB) es una de las proteínas virales más glicosiladas, tiene un promedio de 24 sitios potenciales de N-glicosilación en su secuencia, siendo el componente glúcido el 60% de la masa total [48]. Inicialmente al componente glúcido de esta proteína se le denominó escudo de glicanos (glycan shield) haciendo referencia a su función de enmascarar epítopes conservados en gp120 y de esta manera otorgar un mecanismo de evasión humoral que no afecte la unión del virus a la célula hospedera. Posteriormente, se vio que los glicanos no solo cumplían la función de escudo, sino que una proporción de N-glicanos sería vulnerable al reconocimiento por anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (bnAbs o broadly neutralizing antibodies), demostrando que alguno de estos glicanos posee características que los hacen inmunogénicos.

3.1.2.3.3 Dominio de inmunosupresión

La presencia de este dominio ISU en proteínas de fusión retrovirales se determinó en primera instancia en gammaretrovirus (FeLV, MuLV). Se observó que esta proteína tenía propiedades inmunosupresoras *in vivo* e inhibía la quimiotaxis de monocitos, la secreción de IL-2 por parte de las células T y la blastogénesis de linfocitos *in vitro*. En base a la secuencia aminoacídica de esta región en la proteína TM de gammaretrovirus se diseñó un péptido sintético CKS17 con capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos de diverso origen en cultivo [49] así como la actividad de células NK, producción de Ig por células B y activación y proliferación de linfocito T. Por homología de secuencia con las proteínas TM de otros retrovirus (en particular HTLV) se determinó que presentaba características muy similares al péptido inmunosupresor demostrándose posteriormente la inhibición de la proliferación antes mencionada [49], [50], [51], [52] por parte de este dominio si bien existen algunos aa diferenciales por ejemplo en HTLV y en particular BLV. Ensayos realizados *in vivo* posteriormente confirmaron esta actividad, en este sentido la expresión de Env de MLV, MPMV y HERV podían antagonizar la eliminación por parte del sistema inmune de células tumorales inyectadas en ratones inmunocomprometidos luego de la transducción de estas células con un vector de expresión de Env [52], [53]

Por homología de secuencia entre los dominios ISU los retrovirus pueden clasificarse en 2 grupos: uno que solo contiene los lentivirus y el otro que incluye beta, gamma y deltaretrovirus (**Figura 9**). Si se realiza un alineamiento de las secuencias correspondientes al ISU de ambos grupos se puede observar que solo tres residuos (L1, Q2 y R4) son comunes a ambos grupos.

En lentivirus, concretamente en HIV-1, se ha demostrado la actividad inmunosupresora del dominio ISU presente en gp41. Esto fue evaluado empleando una proteína gp41 recombinante expresada en células de mamífero para poder evaluar correctamente la producción de citoquinas [54]. En este trabajo se demostró que esta proteína era capaz de inducir la liberación de IL-10 e IL-6 en PBMCs proveniente de donadores sanos y se examinó la contribución de los residuos que conforman este dominio en la modulación de expresión de citoquinas. A su vez evaluaron *in vivo* que la respuesta inmune de ratas inmunizadas con la gp41 wt vs una gp41 mut (con una única mutación) induce una mejor respuesta inmune comparado con la proteína wt. Finalmente demostraron que la liberación de IL-10 a partir de PBMCs de donadores fue completamente eliminado cuando un virus infeccioso con una única mutación en la región ISU fue testado mientras que el virus wt eficientemente modulaba la liberación de citoquinas [58].

En el caso particular de VLB, Gatot et al., observaron que mutaciones en el dominio de inmunosupresión afectan la actividad fusogénica de gp30 [55] en particular los aa A361, A365 (este sería la Ala 1 en el

dominio ISU que se emplea para comparar con otros retrovirus, **Figura 9**) y w373. Estas mutaciones no afectaron la infectividad ni la propagación *in vivo*, mostrando el mismo nivel de replicación que el virus wt y además este mutante fue capaz de inducir leucemia en el modelo ovino [55]. Aparentemente en el caso de VLB esta región sería menos tolerante a la presencia de mutaciones (incluso de tipo conservativa) diferencia que presenta por ejemplo con otras proteínas TM como la de HTLV-1, HIV-1 e influenza A que mantiene su potencial fusogénico incluso en presencia de mutaciones conservativas. La presencia de estas mutaciones desestabilizaba la formación del complejo gp51-gp30 posiblemente en este caso debido a que la región ISU en VLB se solapa con el repetido de heptadas que forma parte esencial de la estructura helicoidal (“coiled coil”). Sin embargo, estudios sobre el efecto de mutaciones en el ISU y su capacidad de inmunosuprimir la respuesta inmune no ha sido estudiada aun para VLB.

Grupo 1 (Lentivirus)														Posición
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Consenso
<u>L</u>	<u>Q</u>	A	<u>R</u>	V	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	HIV-1 (gp41)
.	.	.	.	I/V	K/R/Q	.	HIV-1 (gp36)
.	T	.	I	.	K	.	.	K/Q/A	D/H	SIVcpz (gp41)
.	.	.	.	L
Grupo 2 (Beta-, Gamma- y Deltaretrovirus)														Posición
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Consenso
<u>L</u>	<u>Q</u>	N	<u>R</u>	R	G	L	D	L	L	T	A	E	Q	HTLV-1, -II (p21)
A	F	W	.	.	MPMV, SRV-1 (gp20)
.	F	L	K	E	MuLV, PERV (p15E)
.	A	R	Sincitina 1
.	M	A	.	Sincitina 2
.	A	.	Q	I	N	D	L	R	Q	.	V	I	W	HERV-k (gp37)
A	W	.	Y	I	R	L	VLB (gp51) *

Figura 9. Comparación de la secuencia de ISU de retrovirus.

Alineamiento de la secuencia correspondiente al dominio ISU de diferentes retrovirus. Los residuos comunes al grupo 1 y 2 se encuentran subrayados. Adaptado de Morozov et al., [54].

Interesantemente este dominio inmunosupresor también ha sido encontrado en proteínas Env codificadas por retrovirus endógenos como las sincitinas 1 y 2 que se expresan específicamente dentro de la placenta en la interfaz citotrofoblasto-sincitiotrofoblasto, y poseen actividad fusogénica *ex vivo* [56], [57, 58]. En el caso de la placenta al ser considerado un tejido semialogénico que debe ser tolerado por la madre, disponer de una actividad inmunosupresora de estas proteínas sería esencial. En un trabajo de Manganey et al., [59] se demostró que las sincitinas 2 y ERV3 poseen actividad inmunosupresora *in vivo* y participan de la tolerancia materno fetal mientras que la sincitina 1 no. A su vez estos resultados demostraron que la función de ISU en Envs podía ser desconectada de su función mecánica básica asociada con la fusión de membranas. De hecho, se observó que la sustitución combinada de 2 aa entre las sincitinas 1 y 2 era suficiente para otorgar una actividad inmunosupresora en la primera y quitarla de la segunda sin que se pierda la actividad fusogénica.

3.1.2.3.4 *Región citoplasmática de la proteína Env*

La región citoplasmática presente en gp30, es extremadamente larga y es una característica común de las glicoproteínas de superficie retrovirales. Su función está vinculada a la transducción de señales vía motivos de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). La secuencia crítica de los ITAMs consiste en la secuencia YXXL (donde X representa cualquier aa) [37]. Cuando se unen a CD8 los motivos ITAMs de gp30 son capaces de transducir señales a través de la membrana celular luego de la estimulación con un anticuerpo anti-CD8. Estos motivos también son importantes para la incorporación de proteínas Env en el virión y se requieren para la infectividad *in vivo*, así como para el tráfico intracelular de estas proteínas [60], [61].

3.1.2.4 *PROTEÍNA GAG*

Como se mencionó antes en el texto, Gag es una proteína que juega un rol estructural, es responsable del transporte intracelular, participa en el ensamblado de las partículas virales y cataliza el brotamiento de la célula [62]. Gag tiene la capacidad de por sí sola formar VLPs sin la necesidad de la expresión de otra proteína viral. Gag es sintetizada como una poliproteína la cual es clivada en tres dominios funcionales MA, CA y NC [63]. La proteína CA es blanco de la respuesta inmune antiviral, altos títulos de anticuerpos anti-CA son detectables en el suero de animales infectados y además posee dos epítopes CD4+ los cuales son reconocidos por los linfocitos T específicos [64].

En este primer apartado de la tesis describimos brevemente distintos aspectos de la biología del VLB, como son su morfología y ciclo replicativo. Por último profundizamos en las principales características de las dos proteínas más inmunogénicas del VLB, las proteínas Env y Gag. A continuación, se describe la enfermedad que casusa el VLB, la Leucemia Bovina enzoótica, cuales son las estrategias de control y prevención de esta enfermedad y cuales son los problemas asociados a la misma.

3.2 LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

El VLB es el agente causal de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE), una enfermedad neoplásica presente en el ganado bovino. Se estima que más de un 70% del ganado lechero de nuestro país está infectado con VLB, y que dicha infección genera importantes pérdidas económicas en la cadena láctea. Las pérdidas asociadas a la enfermedad por linfosarcoma son las más fácilmente cuantificables, sin embargo, actualmente hay consenso en que la LBE genera otras pérdidas que también pueden ser estimadas. Por ejemplo, varios estudios han analizado el efecto que tiene la enfermedad en la disminución de la producción y calidad de la leche [65], [66], el incremento en el intervalo interparto [67], el aumento en el índice de refugos [68], así como el incremento de los costos de acceso a mercados y planes de control, afectando incluso la venta de productos animales [69]. De hecho, parece existir una clara baja en la productividad y en la rentabilidad aún en el marco de una infección subclínica por el VLB [70], reportándose pérdidas globales anuales en la producción de leche causadas por la infección por VLB de 2,5 a 3,5% [66]. Es importante destacar que estos y otros estudios, a pesar de ser llevados a cabo en diferentes regiones del planeta, son coincidentes en confirmar una pérdida de la productividad; y esta última es incluso significativa cuando parece no haber afectación de la salud del animal. Dado que en muchos países los productos infectados con VLB no son aceptados, existen otras pérdidas económicas asociadas al rechazo de embriones o semen originados en zonas con alta prevalencia de la infección. En este sentido, y dada la existencia de barreras comerciales a nivel internacional que impiden el ingreso de animales en pie infectados, implican ya hoy una sensible limitación para las colocaciones ganaderas nacionales. Por otro lado, y dado que el VLB también puede ser detectado en productos lácteos, y aunque actualmente no existen barreras sanitarias para los mismos, no puede descartarse que sí comiencen a aplicarse en un futuro cercano. Son pocos los trabajos que han intentado cuantificar el problema en términos monetarios, por ejemplo, en el año 1995 se estimó que la reducción en la producción debida al VLB en Estados Unidos representó pérdidas por 285 millones de dólares para los productores y unos 240 millones para los consumidores finales. Esta estimación a su vez tampoco incluye los costos veterinarios asociados al VLB, por lo que probablemente sea una subestimación [66].

3.2.1 PATOGENESIS Y MECANISMO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN

La infección por VLB puede derivar en 3 estadios diferentes pero no necesariamente consecutivos [71],[72], los cuales se profundizan a continuación (**Figura 12**):

1) Etapa asintomática (AL): la infección primaria ocurre cuando células con una o más copias de VLB integradas en su genoma se transmite a través de sangre, semen o leche materna desde un animal infectado un animal susceptible. Luego el VLB se replica activamente e infecta nuevos linfocitos B. El establecimiento de la infección en los nodos linfáticos es importante en diversos virus linfotrópicos (HIV,

SIV o HTLV-1) y VLB no es la excepción. En ovejas infectadas con VLB se detecta una rápida respuesta inmune (4-6 días post infección) no obstante la transmisión de VLB a linfocitos B productores de IgM continúa en paralelo, demostrando la capacidad del virus de evadir la respuesta del hospedero en las etapas tempranas del ciclo infectivo [73]. Si bien VLB puede infectar diversos tipos celulares (monocitos/macrófagos)[74], las principales células infectadas por este virus son los linfocitos B (MHCII+, IgM+, CD5+, CD11b+) [20].

La detección de proteínas y partículas de VLB en el hospedero es muy baja, sin embargo, existe una fuerte respuesta inmune celular y humoral, la cual limita la infección a nuevas células. Sin embargo, aquellas células infectadas conteniendo el ADN proviral en forma silente, no pueden ser eliminadas y se mantienen como un reservorio de células potencialmente productoras de virus gracias a la expansión clonal de los linfocitos o su expansión por división mitótica [20]. En esta etapa la mayoría de los animales infectados con VLB son asintomáticos (cerca del 70%). Esta fase se extiende por varios meses o años y se caracteriza por una desregulación del sistema inmune, principalmente una sobreexpresión de citoquinas.

2) Linfocitosis persistente (LP): luego de un estado de latencia que puede durar meses o años, el 30% al 50% de los animales infectados con VLB desarrollan una proliferación policlonal de células B. Este estadio se caracteriza por un incremento en el número absoluto de **linfocitos B** de sangre periférica asociado a una inversión de la relación T/B. La inmunosupresión junto con el aumento de moléculas inhibitoras de células T inducido por el VLB, juega un rol en la progresión de la enfermedad y en la susceptibilidad a infecciones secundarias (ej. mastitis que conduce a una pérdida en la producción de leche).

3) Linfosarcoma: la manifestación clínica más notoria de la infección por VLB es el desarrollo de tumores en órganos linfoides (ganglios linfáticos, bazo) y otros tejidos. Esta condición ocurre en el 5% a 10% de los animales infectados, predominantemente en animales adultos (3-5 años).

El efecto de la infección por VLB sobre el sistema inmune del hospedero tiene como consecuencia la alteración de las poblaciones celulares (linfocitos B y T), así como desarreglos más generales como ser alteraciones en la producción de citoquinas y en la expresión de receptores celulares, y cambios en las capacidades proliferativas y apoptóticas de algunos tipos celulares.

Alteraciones en la producción de citoquinas

En los bovinos que presentan LP se observa una alteración en los niveles de citoquinas circulantes y su producción en respuesta a estímulos. En un trabajo realizado por Amills et al., observaron que PBMC provenientes de bovinos infectados en estadio LP eran capaces de expresar menor cantidad de ARN mensajero de IL-2, IL-4 e INF- γ , en comparación con aquellas provenientes de bovinos no infectados.

Incluso bovinos infectados en estadio LP expresan menos IL-2 que aquellos bovinos infectados, pero en estadios precoces de la enfermedad [75].

Por otra parte, en un trabajo realizado por Pyeon y Splitter et al., demostraron que PBMC provenientes de bovinos infectados en estadio AL presentan mayores niveles de ARN mensajero de IL-12p40 que las células provenientes de bovinos no infectados [76].

En el mismo sentido, otros investigadores demostraron que bovinos en estadio LP presentan niveles serológicos aumentados de IL-6 en comparación con bovinos en estadio AL y no infectados [77].

La respuesta a estímulos de células del sistema inmune provenientes de bovinos infectados también se ha demostrado alterada, con mayor producción de IL-2 cuando PBMC son cultivadas y estimuladas in vitro [78]; y también de IL-6 en otro trabajo que utiliza diferentes estímulos inmunogénicos [77].

Otros estudios también demuestran una expresión diferencial en PBMC según provengan de bovinos infectados o no [79].

Por otra parte, la infección viral también se correlaciona con la sobreexpresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El TNF- α y los receptores de TNF- α , RI y RII, juegan un importante rol en la patogenia provocada por la infección por VLB. RI y RII, tienen homología en su dominio extracelular, mientras que sus dominios intracelulares de señalización son diferentes [80]. Una hipótesis sobre la correlación entre TNF- α y la patogénesis, se puede describir de la siguiente manera (**Figura 10**): durante la etapa temprana de la infección, células B infectadas con VLB expresan mayor cantidad del receptor RI que RII. Cuando el TNF- α reconoce a RI, se induce la apoptosis y como consecuencia la célula infectada es eliminada. En algunos animales infectados como resultado al cambio de perfil de citoquinas, entre otra cosa, se desarrolla la LP. En este estado, los PBMC expresan mucha más cantidad de RII que RI, y la estimulación por TNF- α induce la proliferación de linfocitos, desencadenando inicialmente una linfocitosis que puede transformarse en leucemia [80].

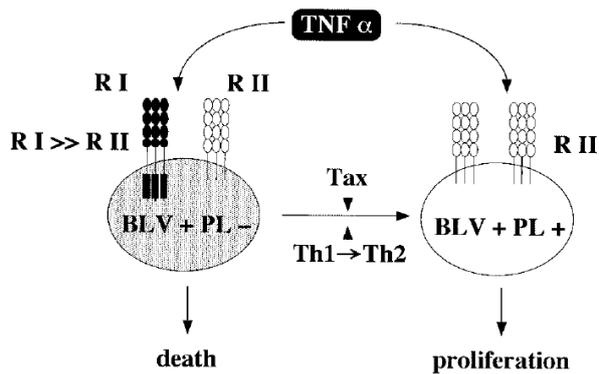


Figura 10. Rol del TNF- α y la patogénesis.

Adaptado de Kabeya et al., [80].

El perfil de citoquinas Th1, juega un rol importante en la inducción de la respuesta celular la cual parece ser crítica en prevenir la progresión de la enfermedad. A su vez, la IL-2, jugaría un rol en promover la progresión de la enfermedad, a pesar de ser una citoquina Th1. Es interesante como IL-2 la cual se conoce como un factor de crecimiento de células T, puede promover la proliferación de células B infectadas con VLB. Además, la IL-2 incrementa los niveles de expresión de proteínas virales y el receptor de IL-2 en células B en animales con LP, sugiriendo esto que la IL-2 contribuye con el desarrollo de la linfocitosis persistente [80].

En suma, el bovino infectado presenta alterado su perfil de secreción de citoquinas, y a su vez la alteración es variable en función del estadio de la infección. En la **Tabla 1** se resumen el perfil de citoquinas Th1/Th2 en el curso de la infección por VLB.

Tabla 1
Cambios en el perfil de citoquinas Th1/Th2 en el curso de la infección por VLB.
Tomado de Kabeya et al., [80].

Th1/2	cytokines	SP ^{a)}	PL ^{b)}	cells tested for cytokine production
Th1	IFN- γ	$\uparrow\uparrow$ ^{c)}	N.T. ^{d)}	ConA-activated PBMC
		$\uparrow\uparrow$	\uparrow	PBMC
		$\uparrow\uparrow$	\rightarrow	PWM-activated PBMC
		$\uparrow\uparrow$	\uparrow	LN ^{e)}
	IL-2	\uparrow	N.T.	ConA-activated PBMC
		$\uparrow\uparrow$	\uparrow	PBMC
		$\uparrow\uparrow$	\uparrow	PWM-activated PBMC
		$\uparrow\uparrow$	\uparrow	LN
	IL-12	\uparrow	\uparrow	PWM-activated PBMC
		$\uparrow\uparrow$	\downarrow	monocytes / macrophage
Th2	IL-10	\uparrow	N.T.	ConA-activated PBMC
		$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	LN
		\uparrow	$\uparrow\uparrow$	monocytes / macrophage

SP: animal serológicamente positivo para VLB, aleucémico, PL: linfocitosis, c) Según la comparación con el control infectado: $\uparrow\uparrow$ muy sobreexpresado, \uparrow sobreexpresado, \downarrow disminución en la expresión, \rightarrow sin cambios en el nivel de expresión; NI: no testado; LN: nodo linfático

Alteración de los linfocitos B

La infección por VLB produce también desarreglos a nivel de la respuesta inmune humoral. Los bovinos con LP presentan una alteración a nivel del sistema inmune humoral dada la expansión policlonal de linfocitos B CD5+. Esta población representa aproximadamente un 30% de los linfocitos B bovinos, pero tras la expansión linfocitaria pasan a constituir el 95% de los linfocitos B del animal en estadio LP [81], [82].

Los linfocitos B de bovinos infectados (tanto en estadio AL como LP) expresan mayor cantidad de moléculas MHC de clase II sobre la superficie celular, en comparación con aquellos de bovinos no infectados [82], [78].

Los bovinos en estadio LP presentan un mayor número de linfocitos B que expresan el receptor PD-L1 (Programmed Death-ligand 1). La proporción de células positivas para PD-L1 a partir de PBMC en bovinos infectados se correlaciona positivamente con el estadio de la enfermedad y con otros predictores de progresión como leucocitosis, carga viral y título de anticuerpos específicos, y a su vez se correlaciona negativamente con el nivel de expresión de INF- γ [83]. El receptor PD-1 (Programmed cell death protein 1) es conocido como un receptor inhibitorio involucrado en la inmunoevasión celular neoplásica y en la patogenia de varias infecciones crónicas. Se ha demostrado cómo un bloqueo de PD-L1 sobre PBMC provenientes de bovinos infectados aumenta la producción de IL-2 e IFN- γ , incrementando la función de los linfocitos T e inhibiendo la expresión de proteínas virales en linfocitos B *in vitro* [84], [85].

Alteración de linfocitos T

Linfocitos T aislados a partir de PBMC de bovinos infectados, presentan un fenotipo característico propio de linfocitos con actividad disminuida. El regulador negativo de la activación y proliferación del linfocito T, LAG3, está aumentado en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de bovinos infectados, tanto en estadio AL como LP [84]. Otros investigadores demostraron que linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de bovinos infectados tanto en estadio AL como LP, expresan mayores niveles de Tim3 (un regulador negativo de la activación y proliferación celular), del mismo modo observaron que a nivel de linfocitos T CD8+ la expresión de Gal9 (ligando de Tim3) está aumentada [86].

Por otra parte, bovinos con LP presentan una proporción mayor de linfocitos T CD4+ que expresan FoxP3 (fenotipo asociado a linfocitos T reguladores). Los linfocitos T reguladores se caracterizan por tener la capacidad de regular la activación, proliferación y diferenciación de otras poblaciones linfocitarias. Existe una correlación positiva entre el porcentaje de linfocitos T CD4+FoxP3+, la leucocitosis total y la carga viral, y una correlación negativa con la expresión de IFN- γ [87]. El porcentaje de linfocitos B/T según la progresión de la enfermedad se muestra en la Figura 11 [88].

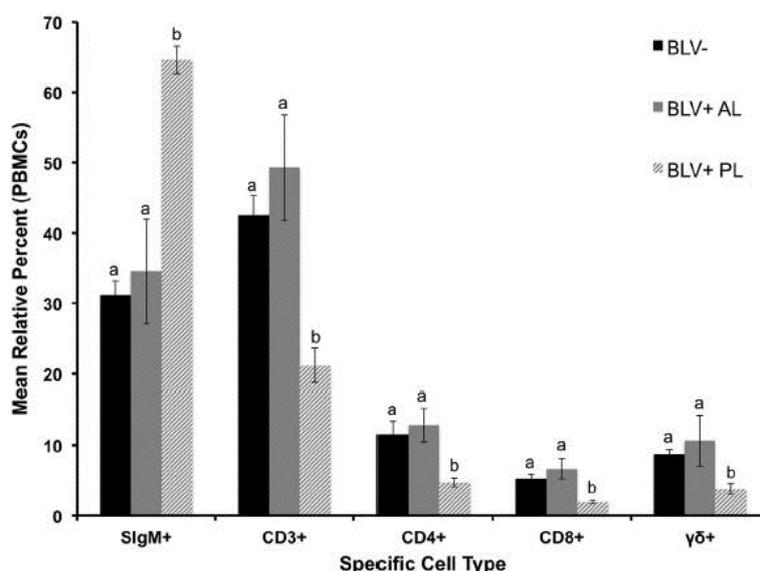


Figura 11. Porcentaje relativo de tipo celular según si es bovino VLB positivo o negativo. Tomado de Frie et al., [88].

Dado su rol en la regulación del sistema inmune, es esperable que estas alteraciones tengan implicancias en el estatus inmunológico del bovino infectado, como por ejemplo en su capacidad de respuesta frente a microorganismos.

Mecanismo molecular de la Leucemogenesis

Se sabe que la región pX del genoma de deltaretrovirus, ubicada entre *env* y el LTR 3', posee genes reguladores que juegan un rol fundamental en el proceso de leucemogénesis. En VLB esta secuencia codifica diversas proteínas reguladoras: Tax (activador transcripcional de la expresión viral y de la vía NF-κB), Rex (exportación nuclear de ARNm virales), R3 y G4 (relacionadas con el mantenimiento de la carga viral). Las proteínas Tax y G4 poseen además potencial oncogénico, y de hecho Tax ha sido propuesta como la responsable de la inmortalización selectiva de linfocitos B CD5+ (productores de IgM) en la etapa de LP, dando ventaja a éstos para que un segundo evento de selección (mutación de p53, polimorfismos del gen BoLA –homólogo de MHC tipo II en vaca- y del promotor de gen TNF-α) complete el proceso de transformación leucémica [71]. La organización genómica y los mecanismos leucemogénicos de VLB y HTLV-1 son muy similares, sobresaliendo la presencia de un gen codificado por la cadena negativa del genoma de HTLV-1, cuyo ARN y la proteína expresada tienen junto a Tax, gran relevancia el proceso leucemogénico: el gen *hbz* [89]. Recientemente fue reportado un ARN antisentido con similares características en VLB y su implicancia en el proceso tumorigénico señalada como de gran relevancia junto con la activación insercional [29], [31]. En referencia a este último punto, estos autores detectaron

que la inserción del ADN proviral no ocurre absolutamente al azar, sino que se da en ciertos “hotspots”, muchos de ellos afectando la actividad de genes relacionados con cáncer o “cancer drivers”. Por último, destacamos la presencia de una región ubicada a 3’ de env que bajo el control del promotor de la ARNpol III es capaz de codificar micro ARN con capacidad de regular el proceso oncogénico [90].

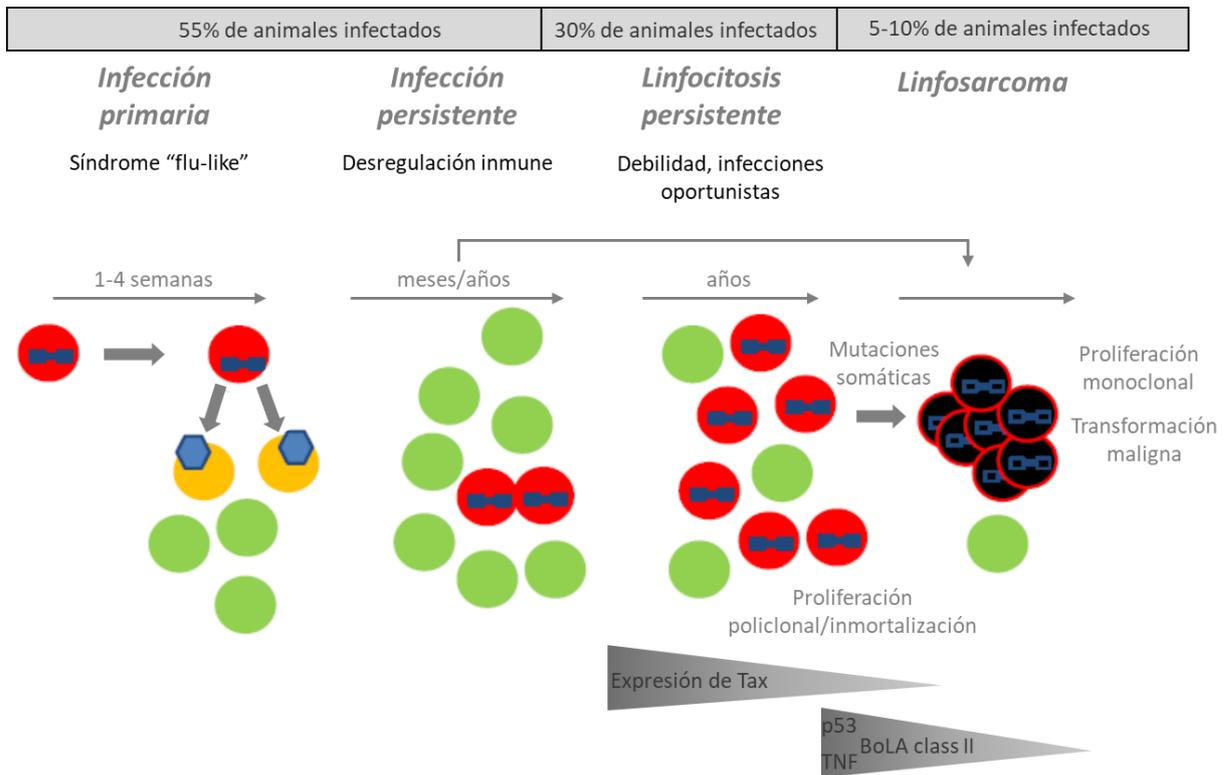


Figura 12. Curso clínico de la infección por VLB.

Célula infectada (roja) con el provirus integrado (azul) es transmitida a un nuevo animal. Durante la **infección primaria** el provirus es expresado en partículas virales (hexágonos azules) que posteriormente infectan linfocitos B (amarillos). La replicación activa es responsable del síndrome tipo gripe (“flu-like”) como el que se observa en la infección primaria por HIV-1. Durante **la infección persistente** las células con los provirus (rojas) se expanden por mitosis debido a la presencia de una fuerte respuesta inmune. Esta fase se caracteriza por una desregulación inmune. Durante la **linfocitosis persistente** (promovida por la acción de Tax) se observa un aumento de las infecciones oportunistas. Finalmente, en la **fase tumoral** una célula infectada sufre mutaciones genéticas (negra) y forma linfomas dentro o fuera de los nódulos linfáticos (con participación de mutaciones en p53, fosforilación de alelos BoLA específicos y actividad en el promotor TNF α). Los tumores también pueden aparecer directamente en animales con infección persistente sin pasar por el estadio de linfocitosis persistente. Adaptado de Gutiérrez et al. [72] y Aida et al., [71].

3.2.2 RESPUESTA INMUNE FRENTE A VLB

La respuesta inmune frente a la infección por VLB está caracterizada por una activa respuesta humoral, y celular. En este sentido, varios trabajos han postulado que la respuesta inmune celular frente al VLB juega un rol crítico en la supresión de la replicación viral, retrasando de esta manera la progresión de la enfermedad [88].

En cuanto a la respuesta humoral, la misma se hace evidente entre las semanas 1-8 luego de la primoinfección [91, 92]. Se producen altos títulos de anticuerpos que reconocen principalmente epítopes estructurales (anti-gp51 y anti-p24), así como también, proteínas reguladoras (Tax y Rex) [20].

Algunos de estos anticuerpos son directamente líticos para las células productoras de BLV

Casi simultáneamente con el período de seroconversión, linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos contra Tax y gp51 aparecen en sangre periférica. Una peculiaridad de los bovinos es que los principales actores en la respuesta citotóxica son los linfocitos T gamma delta ($T\gamma\delta$). La infección por VLB también dispara una respuesta de células T CD4+ colaboradoras virus-dependiente y virus-independiente [20], [93]. Por lo tanto, parece que la infección por VLB induce una respuesta inmune humoral y citotóxica muy activa. Esta actividad antiviral persiste a lo largo de la vida del animal, lo que indica que el sistema inmune es estimulado permanentemente por antígenos VLB. De hecho, el nivel de actividad citolítica mediada por anticuerpos aumenta con la progresión de la enfermedad hacia la fase aguda [94].

3.2.3 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN VIRAL

La transmisión del VLB es sobre todo **horizontal (85% de los casos)**, básicamente mediante la transferencia de células infectadas presentes en la sangre de animales afectados, dado que el virus libre es inestable (**Figura 13**). Así, los animales con LP son muy eficientes en la transmisión viral dado el alto número de células infectadas circulantes. Esta forma de transmisión pone en evidencia que procedimientos iatrogénicos que involucren transferencia de sangre infectada (por ejemplo, el uso de agujas contaminadas) es un vector importante en la propagación de la infección [95]. El simple contacto directo mantenido en el tiempo entre animales infectados y sanos aumenta el riesgo de transferencia de la enfermedad y también ha sido descrita una vía de transferencia de sangre contaminada mediada por insectos hematófagos [96].

La tasa de **transmisión vertical in útero** varía de 4 a 18% [97], siendo mayor el riesgo de contagio en terneros nacidos de una vaca con LP. Del mismo modo, la transmisión viral a través de células infectadas presentes en la leche y el calostro durante la lactancia se considera baja a pesar de la presencia de ADN proviral en ambas secreciones de vacas infectadas [95]. Es así que su descendencia puede mantenerse negativa para VLB por largos períodos de tiempo gracias al rol protector de anticuerpos maternos anti-

VLB presentes en el calostro [98]. La implementación de prácticas que apunten a reducir la transmisión por esta vía ha sido identificada como la principal vía para reducir la prevalencia del VLB en rodeos ganaderos [99], [3].

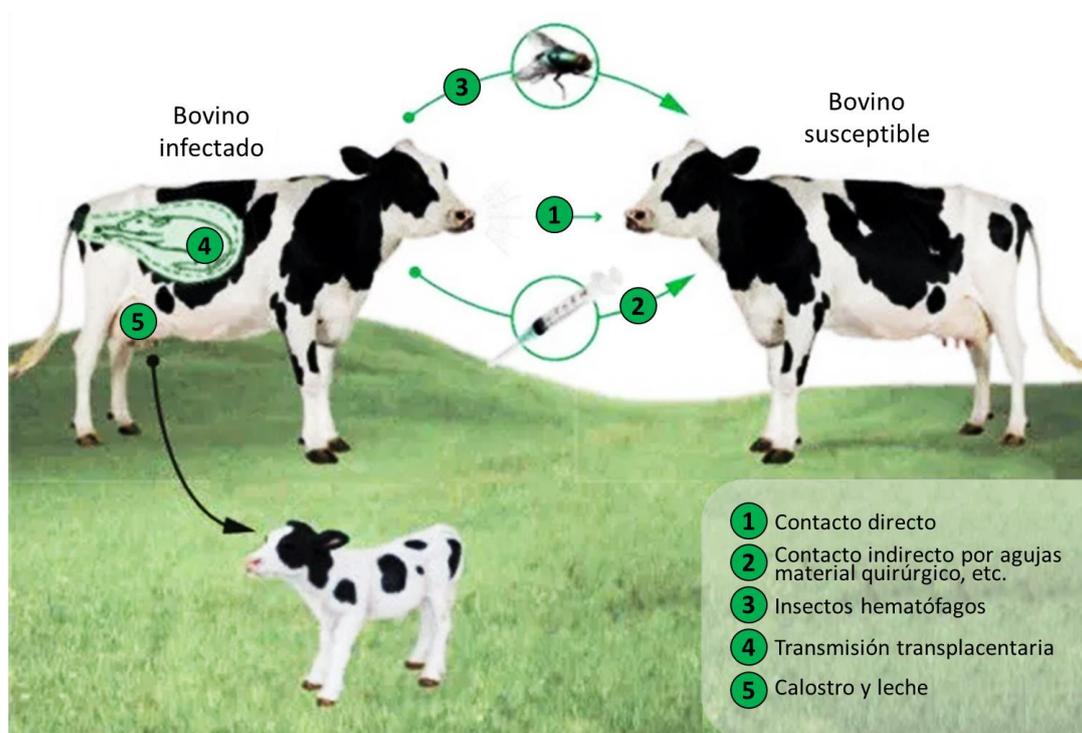


Figura 13. Mecanismos de transmisión viral.

Fuente: <https://www.veterinariargentina.com/revista/2017/12/leucosis-bovina/>.

Los **aspectos zoonóticos** relacionados al VLB han estado bajo la lupa debido a la importancia del ganado vacuno en la dieta humana (carne, leche y derivados). La idea de que el VLB no es transmisible a humanos y que no existen enfermedades humanas atribuibles a este virus, se ha edificado gracias al rigor de múltiples trabajos científicos [100–102]. De todos modos, la presencia de ADN proviral en leche fresca y carne cruda para consumo humano [103] y la detección de anticuerpos contra proteínas de VLB en humanos [104] ha mantenido la incertidumbre en torno al tema. En los últimos años, la duda ha sido reavivada debido a la asociación de este virus con cáncer de mama en humanos, por parte de algunos autores [105–109]. Otros han presentado evidencia en contra de esta asociación [110], [111] manteniendo cierto grado de controversia que ha propiciado la revisión de evidencia a favor y en contra, por parte de diversos autores. Diferentes virus con potencial oncogénico (entre ellos VLB) han sido relacionados con cáncer de mama en humanos, sin embargo, a la fecha no existen evidencias concluyentes de asociación directa entre virus y esta enfermedad.

3.2.4 PREVALENCIA DE LA LBE

La LBE presenta una distribución mundial (Figura 14). En Europa se han implementado medidas de control y campañas de erradicación, logrando conseguir un *status* de libre de LBE en la mayoría de los países de Europa Occidental (en algunos países existen regiones declaradas libres de LBE) [112]. Desde la década de los '90 esfuerzos de erradicación similares se llevaron adelante en Australia y Nueva Zelanda, siendo Nueva Zelanda libre de LBE desde el año 2008 y Australia declarada libre en el 99,7% de los rodeos lecheros en 2013. En Norteamérica, EE. UU. y Canadá reportan una alta prevalencia de LBE sobre todo en rodeos lecheros. Por su parte Sudamérica presenta también altos valores de prevalencia en la mayoría de los países, mientras que en Asia y África algunos países se presentan como libres de VLB [10].



Figura 14. Situación de la LBE en el mundo (período 2018-2020).

En rojo se muestran las zonas y/o países en donde está presente la LBE presente. El contenido de este mapa se basa en la información que figura en los informes oficiales (notificaciones inmediatas e informes de seguimiento, informes semestrales e informes anuales) enviados por los Servicios veterinarios pertinentes a través de OIE-WAHIS (Fuente: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>).

En Uruguay no existen datos precisos de la prevalencia de LBE, no obstante estudios previos indican valores de prevalencia variables entre establecimientos, con mayor prevalencia individual en establecimientos de mayor tamaño y manejo más intensivo (>50%) y una elevada prevalencia a nivel de rodeos (muy pocos establecimientos presentan un 100% de resultados negativos) [113–115]. La prevalencia de la LBE en los rodeos tiende a aumentar con el tiempo como consecuencia de la edad de los animales y el mayor tiempo de exposición a las técnicas de manejo iatrogénicas [116]. A esto se suma la selección de animales negativos para exportación de ganado en pie (impuesta por algunos mercados),

haciendo que la prevalencia de VLB en Uruguay tienda a aumentar (Acta N°84, Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal, (CONAHSA), 2005). Un estudio reciente sobre la situación en EE.UU. muestra resultados de prevalencia similares y destacan el aumento de la misma a nivel país, haciendo hincapié en la importancia de esta enfermedad en la industria láctea y la necesidad de tener en cuenta estos resultados para tomar acciones que tiendan a revertir la situación, atendiendo principalmente a la implementación de medidas para disminuir la transmisión del virus [117].

3.3 ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA LBE

Hasta el día de hoy no existe ningún tratamiento curativo para la LBE, por lo que solamente es posible el control y la prevención de la infección. A este respecto, Rodríguez y col. revisaron el tema de distintas estrategias terapéuticas y preventivas para combatir la infección por VLB [3] (36), donde destacamos las siguientes:

a) Identificación de los animales infectados, segregación y eliminación preferencial de los mismos. Para ello, un principio fundamental es la correcta identificación de los animales infectados mediante pruebas diagnósticas confiables y periódicas, y su posterior segregación del rodeo o eliminación. En países con baja/media prevalencia inicial (Europa occidental y algunos países de Oceanía) se lograron desarrollar programas de este tipo muy exitosos.

Sin embargo, en países de alta prevalencia como el nuestro, este tipo de programas de erradicación por sí solos son de muy difícil implementación dados sus altos costos [112].

Sin embargo, existen otras estrategias que, sumadas a la anterior, en el contexto de un país como Uruguay y países de la región con alta prevalencia podrían ser aplicadas.

Por ejemplo, la identificación y eliminación preferencial de animales super-transmisores caracterizados por tener alta linfocitosis y/o carga viral muy elevada podría ser una medida a adoptar por los productores. Se ha visto que existe una correlación entre la carga viral, la leucocitosis/linfocitosis y los niveles de anticuerpos anti-VLB [118].

b) Selección genética de individuos con capacidad natural de controlar la infección (controladores naturales). Al igual que en el caso de humanos infectados por VIH, se ha descrito la existencia de bovinos que tienen una capacidad natural de controlar la infección por VLB, presentando muy bajas cargas provirales en forma prolongada. La presencia de ciertos alelos específicos del sistema mayor de histocompatibilidad bovino (BoLA) se asocia con dicho fenotipo controlador de la infección. Por tanto, basados en el hecho de que existe un componente heredable de la enfermedad (aproximadamente 8%),

podría plantearse el aumento de la frecuencia de genotipos resistentes a la misma mediante programas de mejoramiento genético [119].

c) Vacunación. Las medidas preventivas más eficientes contra las infecciones virales incluyen estrategias de inmunoprotección mediante vacunación [90]. Sin embargo, para el caso de las infecciones por retrovirus estas estrategias de inmunoprotección hasta ahora no han sido totalmente exitosas debido a ciertas características propias de estos virus.

3.4 VACUNAS

Varios trabajos fueron llevados a cabo con el objetivo de desarrollar una vacuna eficaz contra el VLB mediante la aplicación de diferentes estrategias, las cuales se describen a continuación. Analizaremos con más detalle en la sección siguiente las diferentes vacunas desarrolladas hasta el momento.

1. Vacunas a virus inactivados

En los primeros ensayos de vacunación se evaluaron preparaciones de virus inactivados obtenidos a partir de líneas celulares persistentemente infectadas con VLB (FLK, LK15, Bat₂Cl₁). La inactivación viral se llevó a cabo mediante tratamiento con diferentes agentes químicos (N-acetiltilenimina, 0.1% TritónX-100, 0.1% formalina, formaldehído, compuestos aminometilados). Estas vacunas a virus inactivados fueron capaces de inducir una fuerte respuesta inmune humoral, específica y neutralizante, capaz de proteger ovejas y vacas cuando eran desafiadas con bajas dosis de virus. La protección se correlacionó con la eficacia de la vacuna para inducir una fuerte respuesta humoral neutralizante. Sin embargo, los animales vacunados se infectaron cuando se desafiaron con altas dosis de virus, mostrando por tanto una eficacia limitada [120],[121],[122], [123].

2. Vacunas derivadas de lisados celulares

Varios tipos de lisados celulares fueron evaluados para su uso como vacuna, tales como: ganglios tumorales de vacas leucémicas, células FLK o SF-28 infectadas con VLB fijadas con 3% de glutaraldehído 178, o células ovinas NP2 productoras de las proteínas virales Env (gp51 y gp30) y cápside (p24) 179,180. Aunque algunos de estos ensayos dieron lugar a una protección parcial, esta estrategia tiene el riesgo intrínseco de transmitir infección

3. Vacunas recombinantes a subunidad

Las primeras vacunas a subunidad se diseñaron con la glicoproteína Env (gp51) dado su alto nivel de conservación y que contiene epitopes neutralizantes [124], [125], [126, 127]. La secuencia de gp51 está bien conservada entre los aislados de BLV [128], [18] y lleva al menos tres epítomos neutralizantes [129], [130–135]. Vacunas basadas en la proteína gp51 purificada a partir de sobrenadante de cultivo de células

FLK inactivada con 0.01% de N-acetiltilenimina, demostró ser inmunogénica pero no fue capaz de proteger frente al desafío con VLB [124]. Experimentos similares utilizando como adyuvante Al(OH)₃ también fallaron en prevenir la infección con VLB de terneros [126]. Resultados similares se obtuvieron con la proteína p24 [124].

Cabe destacar que en estos primeros ensayos de vacunación (puntos 1, 2 y 3) se incluyeron pocos animales y se llevaron a cabo en cortos períodos de tiempo. Más importante aún, la principal preocupación de estos experimentos era determinar la dosis de desafío correcta en condiciones reales de rebaño. Por otro lado, un problema importante de estas vacunas fue que la respuesta inmune humoral generada descendía rápidamente y, aunque importante, parece por sí sola no ser suficiente para conseguir una protección total contra la infección por VLB. Aunque importante, la respuesta humoral pareció ser insuficiente en lograr una protección contra la infección por VLB [36, 136]. Además, los títulos de anticuerpos mostraron una rápida disminución en animales vacunados, una característica no deseada en una vacuna eficaz. Debido a esto, en los trabajos siguientes de vacunación, se hizo más hincapié en el componente celular de la respuesta inmune.

4. Péptidos sintéticos

Se probaron como potenciales inmunógenos péptidos sintéticos cortos que imitaban epítopes de células B y T presentes en gp51 [137, 138]. El análisis primario de la utilización de péptidos cortos de proteínas virales como inmunógenos, formando parte de liposomas, mostró la generación de una respuesta humoral y celular Th1 específica anti-VLB tanto en modelos murinos como ovinos [139–141]. En otro trabajo en el cual se incluyeron múltiples péptidos sintéticos de epítopes Th y B no lograron inducir protección luego del desafío a pesar de haber generado una respuesta inmune celular. En el corto plazo, la vacuna redujo parcialmente la replicación del BLV [125]. Finalmente, un péptido correspondiente a un epítope CTL presente en gp51 con adyuvante de Freund indujo una respuesta mediada por células, pero no fue capaz de proteger a los ovinos frente al desafío [142, 143]. Sin embargo, otros trabajos no han conseguido generar una protección mantenida en el tiempo con la utilización de esta estrategia. El uso de péptidos sintéticos ha mostrado pobres resultados, probablemente debido a conformaciones inadecuadas o fallas en la presentación de epítopes.

5. Vacunas ADN

Las vacunas ADN conteniendo el gen *env* bajo el control del promotor del citomegalovirus estimularon una respuesta celular adecuada, aunque la respuesta humoral fue pobre [144]. Otro intento se realizó con un vector diseñado para la expresión de la proteína transactivadora Tax. Estudios iniciales mostraron resultados alentadores luego del tratamiento con esta vacuna en ovejas; sin embargo, un trabajo

posterior también realizado en ovinos mostró que la protección frente a la infección por VLB que ocurría inicialmente, no prevenía una infección posterior [145].

6. Virus Vaccinia recombinante

El Virus Vaccinia recombinante (VVR) ha sido empleado como vehículo de antígenos de VLB en ensayos de inmunización. El VVR es un vector recombinante vivo que tiene una amplia especificidad de rango de hospedadores, y tiene la capacidad de provocar tanto una respuesta inmune humoral como celular. Estudios preliminares empleando VVR que expresan la subunidad gp51 fueron incapaces de generar una respuesta inmune humoral y protección en ovejas ni conejo. En contraste, VVR con la proteína Env completa (conteniendo las subunidades gp51 y gp30), fue capaz de generar una eficiente respuesta humoral y de células T CD4+ en modelos ovinos [136], [138], [146], [139], [147], [148]. Sorprendentemente, la vacunación con RVV-env en bovinos dio como resultado un aumento de los títulos de anticuerpos IgG1 que podría indicar una respuesta de tipo Th2. Un vector RVV que expresando los genes gag, pol y env, tampoco fue capaz de proteger luego del desafío [148], [149]. Desafortunadamente, las vacunas a VVR-env se mostraron poco eficientes cuando se probaron en vacas.

7. Infección competitiva por provirus atenuados

El uso de una vacuna atenuada compuesta por un provirus conteniendo múltiples deleciones y mutaciones en genes implicados en la patogénesis representa una estrategia muy promisoría. Este provirus contiene mutaciones en genes oncogénicos (tax, G4, microARNs) y genes implicados en la infectividad o replicación (env y G3) [150]. Esta vacuna atenuada tiene la característica de poseer capacidad infecciosa, con bajos niveles de replicación en vacas, y además es capaz de estimular eficientemente la respuesta inmune humoral y celular. En condiciones de campo, se pudo observar que las vacas vacunadas con este provirus fueron capaces de transmitir anticuerpos de manera pasiva a los terneros recién nacidos a través del calostro los cuales persistieron durante varios meses. Así mismo, no se vio transmisión del provirus atenuado de vacas a terneros, y tampoco se detectó en leche ni en carne. Finalmente, los animales vacunados resisten al desafío con un virus VLB salvaje [151]. Sin embargo, este tipo de vacuna atenuada tiene algunos riesgos asociados tales como: a) la posible ocurrencia de deriva genética con la posible reversión a la secuencia de tipo salvaje; b) el cambio antigénico como resultado de la recombinación con un virus salvaje; c) la adquisición de mutaciones que aumenten la patogenicidad, como por ejemplo la sustitución de N230E [150].

La falla de las "vacunas tradicionales" asociada a una estimulación inadecuada o de corta duración, lleva a pensar que la vacuna ideal, debería contener una gran cantidad de factores virales que estimulen permanentemente la respuesta inmune. En este sentido, las vacunas basadas en provirus atenuados

cumplirían con estos requerimientos. Si bien esta estrategia parece ser auspiciosa, varios aspectos regulatorios deben ser resueltos antes de su uso masivo.

Virus Like Particles (VLPs)

Una alternativa a las vacunas tradicionales es el uso de VLPs (por su nombre en inglés virus-like particles), las cuales representan una de las estrategias más atractivas actualmente en el campo de las vacunas para animales [152], [153]. Las VLPs son estructuras proteicas que mimetizan la estructura de los virus nativos, pero tienen la ventaja de carecer de genoma viral, lo que las hace más seguras (sin riesgos de replicación del virus) y son altamente inmunogénicas [154], [155]. Las vacunas basadas en VLPs combinan varias de las ventajas de las vacunas a virus atenuados o inactivados, así como también de las vacunas a subunidades recombinantes, integrando características clave que subyacen a su inmunogenicidad y seguridad. Estas características son a) su naturaleza particulada y multivalente, b) su geometría definida y con estructuras ordenadas y repetidas en su superficie, c) preservación de la conformación antigénica nativa, d) son más seguras, e) altamente estables, f) aplicables como vectores para la presentación de antígenos foráneos, ligados o drogas, g) permiten diferenciar entre animal vacunado y el infectado (DIVA: “Differentiating Infected from Vaccinated Animals”) (Figura 15) [156].

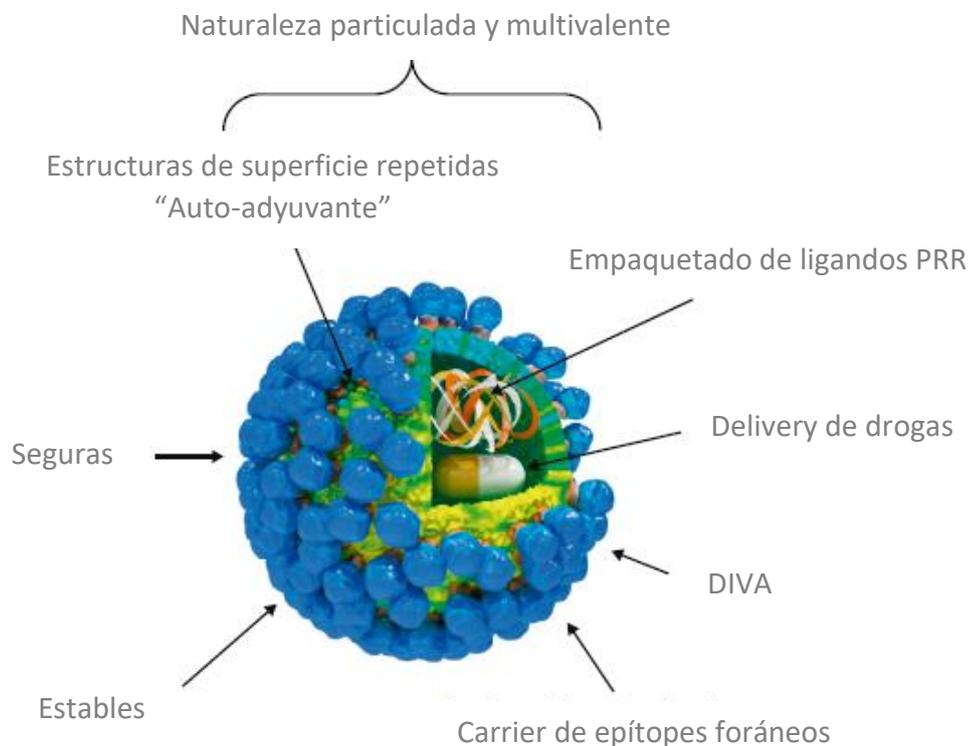


Figura 15. Características de las VLPs.

Las VLPs poseen características deseables para una vacuna: (a) geometría bien definida y estructuras ordenadas y uniformes, (b) conservación de la conformación antigénica nativa; (c) naturaleza particulada y multivalente; lo cual favorece el reconocimiento y absorción de manera eficiente por las células presentadoras de antígenos, (d) seguras ya que carecen de genoma ADN o ARN eliminando por completo cualquiera de los riesgos asociados con la replicación,

reversión, recombinación de virus; (e) mayor estabilidad que los antígenos solubles en condiciones ambientales extremas; (f) aplicabilidad como delivery de epítodos foráneos, fármacos; (g) posibilidad de seguir la diferenciación de los infectados de animales vacunados (DIVA). Adaptado de Crisci et al., [157].

Debido a su naturaleza particulada y altamente ordenada las VLPs constituyen motivos moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales son reconocidos y procesados de manera muy eficiente por las células presentadoras de antígeno (APC), lo que lleva a una potente activación de las respuestas inmunitarias humorales y celulares (Figura 16) [152], [77]. Según su estructura, las VLPs se pueden clasificar como del tipo de VLPs envueltas (poseen membrana lipídica derivada de la célula), o VLPs no envueltas, compuestas únicamente por una o más proteínas (Figura 17) [158]. Las VLP se producen en diferentes sistemas celulares, que incluyen levaduras, bacterias, mamíferos, plantas y células de insectos, ofreciendo cada uno de los sistemas de expresión ventajas y desventajas [156], [159], [158].

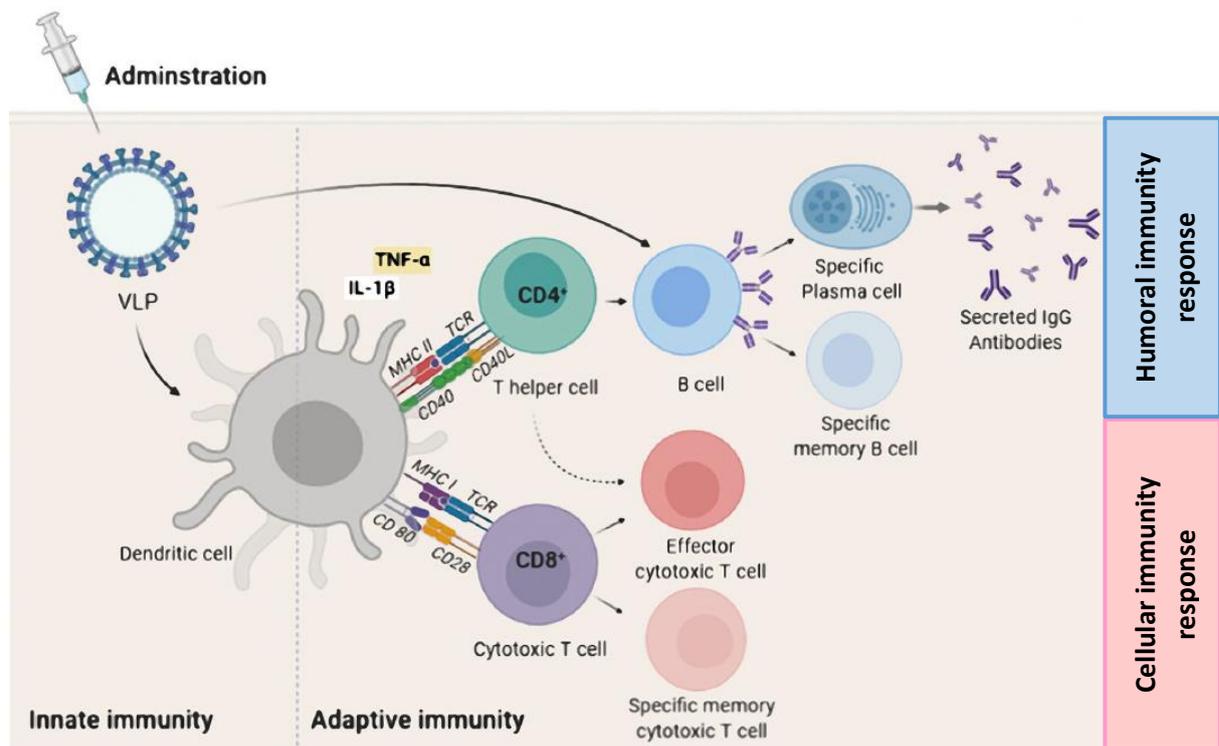


Figura 16. Respuesta inmune adaptativa inducida por las vacunas basadas en VLPs.

Luego de la administración, las VLPs son reconocidas y procesadas por las APC, presentadas por los MHC-I y MHC-II y reconocidos por los linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente. La interacción entre las células T CD4+ y las células B es importante para lograr la diferenciación a plasmocitos secretores de anticuerpos y la generación de células B de memoria. Para la inducción de la respuesta inmune celular, los linfocitos T CD8+ inmaduros proliferan y se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTL) efectoras y de memoria específicos. Las células T CD4+ efectoras incrementan la presentación de antígeno por parte de las APC mediante la secreción de citoquinas, así como también asiste a la actividad CTL. Adaptado de Nooraei et al., [158].

Actualmente existen vacunas basadas en VLPs licenciadas para su uso en humanos (Cervarix®, Gardasil®, Hecolin®) y en animales (Porcilis PCV®) y más de 100 candidatos están bajo pruebas clínicas [160]. En la **Tabla 2** se muestra el estado al 2021 de las vacunas basada en VLPs aprobadas por la FDA o en fase de ensayo clínico para humanos [152].

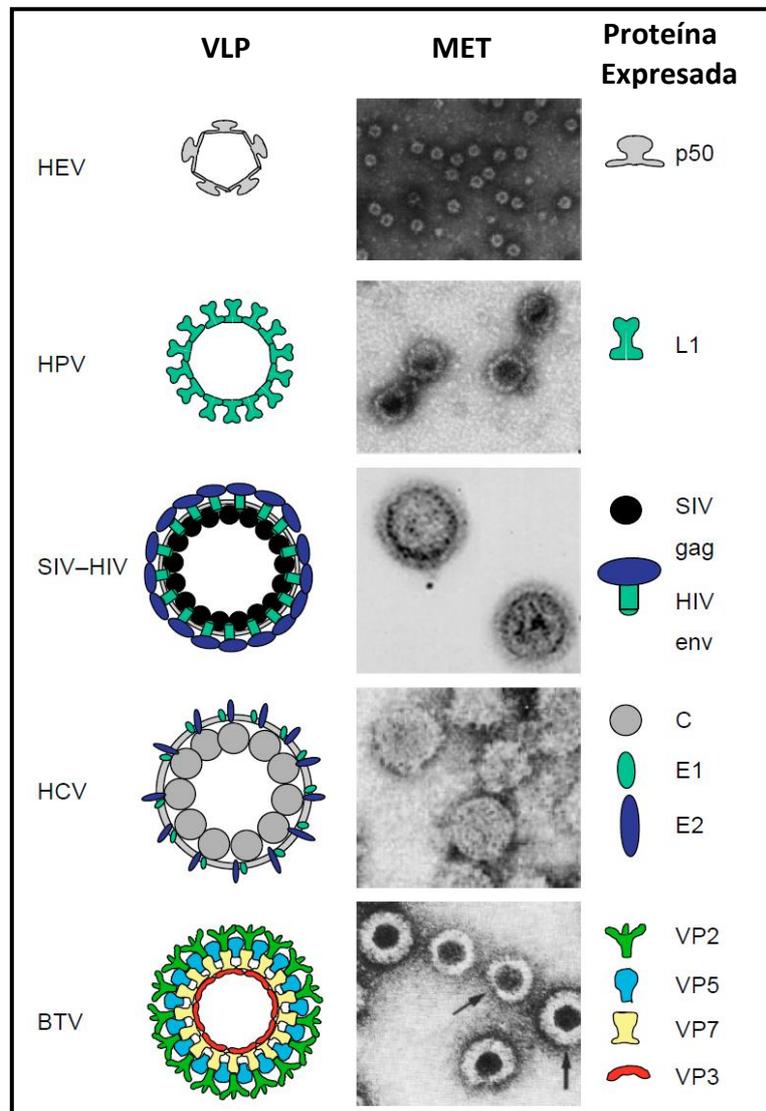


Figura 17. Ejemplos de VLPs.

En esta figura se muestran esquemas representativos de distintos tipos de VLPs para una variedad de virus. En cada caso, se muestra la micrografía electrónica correspondiente a cada VLP. Se muestran VLPs envueltas compuestas por dos proteínas (VLP híbrida de SIV-HIV) o con más de 2 proteínas (VLP de HCV) y VLP no envueltas, compuestas por una simple capa formada por una proteína (HEV y HPV) o compuestas por más de 3 proteínas (BTV). Abreviaturas: BTV: Virus Lengua Azul, HCV: Virus Hepatitis C; HEV: Virus Hepatitis E; HPV: Virus Papiloma Humano; SIV-HIV: VLP híbrida conteniendo la proteína del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) y la proteína Env del Virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV). Adaptado de Noad et al., [164].

Previamente, se han generado VLPs de Deltaretrovirus (HTLV y VLB) las cuales han sido producidas en distintos sistemas de expresión, tales como células de mamíferos [161] o células de insecto [25, 33], pero compuestas únicamente por la poliproteína Gag, siendo el objetivo principal el estudio de ensamblado de la cápside y no su uso como inmunógeno. En un trabajo realizado por Otsuki et al., generaron VLPs de VLB formadas por la proteína Gag wt o Gag conteniendo un péptido que corresponde a un epítipo CD4+ optimizado para ajustarse a BoLA-DR bovino. Dicho péptido está asociado a un efecto en la reducción de la carga proviral de ganado infectado con BLV. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido reportado el uso de estas VLPs en ensayos de inmunización [163].

Tabla 2

Vacunas contra enfermedades infecciosas basadas en VLPs aprobadas por la FDA o en Etapa de ensayo clínico.

Nombre	Agente infeccioso	Enfermedad	Estado	Empresa	Antígeno(s)	Sistema de expresión
Gardasil®	Virus del Papiloma Humano (HPV)	HPV-6, -11, -16, -18, -31, -33, -45, -52 y -58	Aprobada	Merck	Proteína mayor de cápside L1 de los tipos de HPV -6, -11, -16 y -18	Levadura
Gardasil9®	Virus del Papiloma Humano (HPV)	HPV-6, -11, -16, -18, -31, -33, -45, -52 y -58	Aprobada	Merck	Proteína mayor de cápside L1 de los tipos de HPV -6, -11, -16, -18, -31, -33, -45, -52 y -58	Levadura
Cervarix®	Virus del Papiloma Humano (HPV)	HPV-16 y -18	Aprobada	Glaxo-SmithKline Inc	Proteína mayor de cápside L1 de los tipos de HPV -6 y -18	Células de insecto
Sci-B-Vac™	Virus de la Hepatitis B	Hepatitis B	Aprobada	VBI Vaccines	3 epitopes del antígeno de superficie: S, Pre-S1 y Pre-S2	Células de mamífero CHO
Mosquirix™	Plasmodium falciparum	Malaria	Aprobada	Glaxo-SmithKline Inc	Proteína de Plasmodium falciparum fusionada con Ag de superficie de HBV combinada con el Ag S	Levadura
SN	Virus Influenza	Influenza estacional	Ensayo clínico fase III (Nº ensayo: NCT03301051)	Medicago	Mix de proteínas H1, H3 tipo A y 2 tipo B	Planta (Nicotiana benthamiana)
SN	Virus Influenza	Influenza pandémica	Ensayo clínico fase II	Medicago	Hemaglutinina (HA)	Planta
SN	SARS-CoV-2	COVID-19	Ensayo clínico fase I (Nº ensayo: NCT04450004)	Medicago	Proteína spike de SARS-CoV-	Planta (Nicotiana benthamiana)
NanoFlu™	Virus Influenza	Influenza estacional	Ensayo clínico fase III (Nº ensayo: NCT04120194)	Novavax	Hemaglutinina (HA)	Células de insecto
ResVax™	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)	RSV	Ensayo clínico, Fase III	Novavax	Proteína de fusión F de RSV	Células de insecto
VVX-CoV2373	SARS-CoV-2	COVID-19	Ensayo clínico, Fase I	Novavax	Proteína trimerica spike de SARS-CoV-2	Células de insecto
Ebola GP Vaccine	Virus Ebola	Ebola	Ensayo clínico, Fase I	Novavax	Proteína de Ebola	Células de insecto
Hecolin®	Virus de la Hepatitis E	Hepatitis E	Aprobada	Xiamen Innovax Biotec	Segmento A de la proteína de cápside (ORF2) genotipo 1 de HEV	
SN	Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)	SIDA	Ensayo clínico, Fase I (Nº ensayo: NCT00001053)	Univ. of Rochester AVEG, Rochester, USA	HIV p17/p24:Ty-VLP	Levadura
SN	Virus Norwalk	Gastroenteritis Aguda	Ensayo clínico, Fase I (Nº ensayo: NCT00973284)	Takeda	Proteína derivada del genotipo GI.1 de norovirus	Células de insecto

SN: sin nombre establecido. Adaptado de Nooraei et al., [152].

3.5 PROBLEMA IDENTIFICADO

La problemática de la LBE puede describirse en 3 niveles de organización diferentes:

a) Problema sanitario de la LBE. A nivel nacional más del 70% del ganado lechero está infectado, afectando esto directamente a la producción de la cadena láctea. A nivel internacional existen barreras que impiden el ingreso de animales en pie infectados, implicando una sensible limitación para las colocaciones nacionales. El VLB también puede ser detectado en productos lácteos, y aunque actualmente no existen barreras sanitarias para los mismos, no puede descartarse que sí existan en el futuro. La relevancia de este problema se expresó con mucha claridad en la “Propuesta de líneas de investigación y acciones para el PLANISA” (Gil, A., Nari, A. e Hirigoyen, D.; 2009 - www.fvet.edu.uy/planisa/files/Trabajo_final_090904.pdf), a partir de consultas a representantes de todos los eslabones de la cadena láctea.

b) Estrategias para el control veterinario de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, en la actualidad no existe ningún tratamiento para la LBE y solo es posible el control y la prevención de la enfermedad. Barros y cols. describen que los principios fundamentales para la prevención de la LBE son: 1) implementar prácticas de manejo veterinario que eviten la contaminación de animales negativos, 2) la realización de técnicas de diagnóstico rutinarias que permitan identificar a los animales infectados, 3) eliminación o separación de los animales positivos de los negativos. Estos procedimientos han sido exitosos para disminuir la prevalencia y erradicar la enfermedad en regiones con baja prevalencia (aproximadamente 20%) en Europa, Australia y Nueva Zelanda [112]. Dada la alta prevalencia de la enfermedad en nuestro país, la necesaria e imprescindible aplicación de estos programas sería de difícil instrumentación, con resultados esperados positivos solo a largo plazo.

c) Dificultad en la generación de una vacuna eficaz. Se han desarrollado varios trabajos con el objetivo de generar una vacuna eficaz contra el VLB (descrito en el punto 1.7), sin embargo, hasta ahora ninguno logró constituirse en un producto comercial que genere inmunidad a largo plazo. Las principales fallas se relacionaron con una respuesta inmune incompleta o transitoria, con incapacidad de generar una memoria inmunológica efectiva. Por otro lado, la infección por el VLB genera una inmunosupresión en los animales afectados, mediante los siguientes mecanismos propuestos: 1) disrupción en la producción de citoquinas y moléculas de señalización, 2) perturbación de la proliferación de células y apoptosis de linfocitos, y 3) eliminación de células infectadas activadas. Si bien la inmunosupresión se ha demostrado ampliamente, muy pocos trabajos se han llevado a cabo para evaluar su impacto sobre la salud y el bienestar del ganado, sobre todo en lo que respecta a su efecto sobre las inmunizaciones del ganado y la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas [165], [88].

Sin embargo, en comparación con otros retrovirus el VLB presenta la ventaja de tener una estabilidad genómica relativa, en contraste con la divergencia de cuasiespecies en HIV. Esta baja variabilidad genética representa una característica que favorece al desarrollo de una vacuna. Por otro lado, la presencia de anticuerpos neutralizantes en suero y calostro en animales infectados, demuestran que una respuesta inmune efectiva podría ser alcanzada [72].

La dificultad en la generación de una vacuna eficaz representa un problema general para otros retrovirus de importancia en salud humana, como por ejemplo el HIV o HTLV. Con más de 30 años de estudio aún no se ha podido generar una vacuna eficaz contra el HIV. En este sentido las propiedades biológicas de HIV (al igual que otros retrovirus) hacen que el desarrollo de una vacuna exitosa sea muy difícil. Las vacunas en general no protegen de la infección (tal es el caso de Influenza, o SARS-CoV-2), sino que limitan la replicación viral, y por ende el desarrollo de la enfermedad, al menos grave. En el caso de los retrovirus, luego del establecimiento de la infección crónica, la misma no se resuelve, siendo a la respuesta inmune generada insuficiente y como consecuencia una replicación viral continua e implacable. Características como la capacidad de generar y tolerar muchas mutaciones o el alto grado de glicosilación en la glicoproteína Env, son mecanismos de evasión desarrollados que impiden el reconocimiento por parte de anticuerpos, o la generación de anticuerpos no neutralizantes. Estas propiedades tienen importantes consecuencias para los esfuerzos de desarrollo de vacunas.

La respuesta natural anti VLB muestra una persistencia de la actividad antiviral a lo largo de la vida del animal, lo que indica que el sistema inmune es estimulado permanentemente por antígenos virales pero dicha respuesta no es suficiente para resolver la infección. Para el caso de retrovirus, resulta muy importante conocer los mecanismos utilizados por el virus para escapar a la respuesta y cronificar la infección. Posiblemente el desarrollo de vacunas eficaces contra retrovirus en general implique la activación de mecanismos inmunológicos que impidan estas estrategias de evasión viral. Por otro lado, el desarrollo de vacunas anti-retrovirales puede tener un objetivo preventivo sobre individuos no-infectados que disminuirían el riesgo de infección, así como también podrían tener como objetivo terapéutico en individuos previamente infectados para disminuir la carga viral, eliminar células infectadas y bajar la transmisión viral.

4 OBJETIVOS DE LA TESIS

El **objetivo general** de esta tesis consiste en producir nuevos inmunógenos contra el Virus de la Leucemia Bovina (VLB) mediante la producción de las proteínas Gag y Env recombinantes en un sistema de expresión eucariota y analizar sus propiedades antigénicas e inmunogénicas. Generar herramientas que permitan medir la infección por el VLB.

En este sentido los **objetivos específicos** son:

OE1) Producir y caracterizar mediante técnicas biofísicas, bioquímicas e inmunológicas Virus Like Particles de VLB.

OE2) Analizar las propiedades inmunogénicas e inmunosupresoras del ectodominio de la proteína Env de VLB y un mutante en el dominio de inmunosupresión en el modelo murino.

OE3) Generar un sistema reportero para la infección por VLB utilizando un sistema lentiviral de segunda generación, para su aplicación en el análisis capacidad neutralizantes de sueros, ensayos de compuestos con actividad antiviral, y en la evaluación de la capacidad infectiva de muestras.

5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Teniendo en cuenta las experiencias previas en el desarrollo de una vacuna contra el VLB, sumado a la experiencia que hemos adquirido tanto en la biología viral como en aspectos funcionales y estructurales de algunas de sus proteínas componentes, es que nos planteamos la generación de inmunógenos basados en la producción de partículas similares a virus (*Virus-Like Particles, VLPs*). A diferencia de las vacunas a virus vivos, las VLPs no son infecciosas y no tienen la capacidad de replicarse ya que no contienen el genoma viral. Se asemejan a las vacunas de subunidades virales, pero con mayor poder inmunogénico, haciendo que las dosis antigénicas se reduzcan, y desciendan tanto la cantidad de dosis necesarias para generar respuesta como el uso de adyuvantes. Hoy en día varias vacunas de este tipo dirigidas a combatir enfermedades infecciosas están siendo probadas en ensayos clínicos, y algunas ya están siendo comercializadas [152]. Como ejemplo, esta estrategia ha sido planteada como un posible componente de una vacuna contra el VIH-1 [166]. Estas VLPs estarán formadas por dos de las proteínas más inmunogénicas de VLB, la proteína Gag en el interior de la partícula y la glicoproteína Env en su superficie. Estas partículas presentarán y activarán al sistema inmune en condiciones similares a las existentes en los viriones infectantes, pero no serán infecciosas.

Por otro lado, la disrupción específica de la actividad ISU de las proteínas Env en retrovirus infectivos como VLB a través de mutagénesis dirigida de su dominio ISU puede permitir una caracterización certera del papel de la inmunosupresión. El contar con proteínas mutadas que no presenten esta actividad inmunosupresora de la respuesta inmune del huésped, abre la posibilidad de su uso como componente en una vacuna más efectiva en la generación de protección frente a la infección viral. Por otra parte, nos acerca a elucidar una caracterización certera del papel que juega la inmunosupresión para generar una infección retroviral efectiva *in vivo*.

Por último, nos propusimos generar un sistema reportero de la infección por VLB que permita realizar el screening de múltiples muestras, como por ejemplo análisis de la capacidad neutralizantes de sueros, ensayo de compuestos con actividad antiviral, así como también la evaluación de la capacidad infectiva de muestras.

A continuación, se presentará en forma esquemática la estrategia experimental que se llevó a cabo para cumplir con los objetivos específicos planteados 1 y 2 (Figura 18).

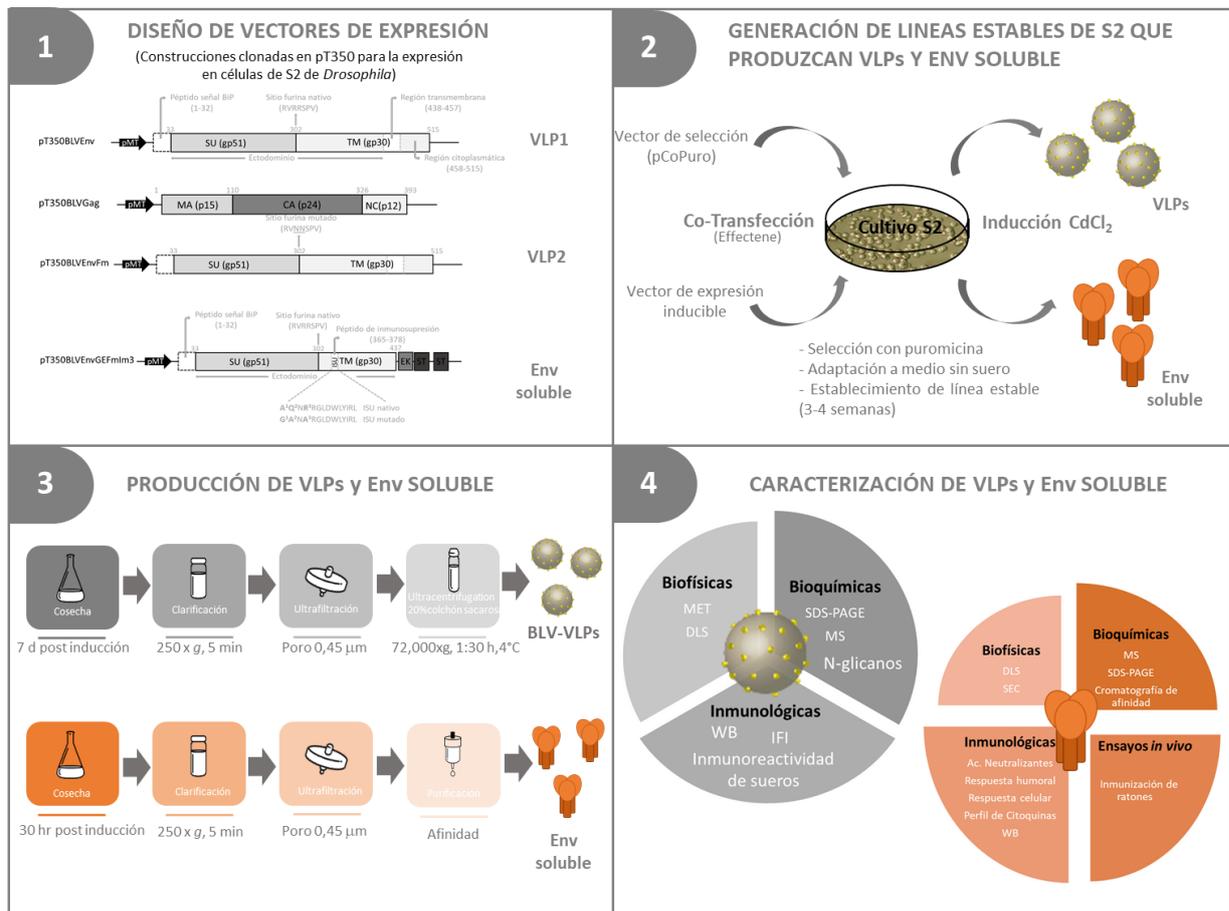


Figura 18. Estrategia experimental.

Representación esquemática de la estrategia experimental que se llevó a cabo para cumplir con los objetivos específicos planteados.

El diseño y la construcción de los plásmidos conteniendo Gag y Env, para dar lugar a las VLPs, así como también las construcciones para la obtención de las glicoproteínas Env solubles (con y sin mutaciones en el péptido ISU), fue uno de los primeros pasos del proyecto. Nuestro laboratorio dispone del plásmido pT350 diseñado para la expresión inducible de proteínas recombinantes para su expresión en células S2 de *Drosophila melanogaster* [167], el cual utilizamos para realizar todas las construcciones. Una vez obtenidas las construcciones, se generaron líneas estables de células S2. Estas líneas estables fueron utilizadas para la producción de las VLPs conteniendo Gag en el interior y Env en la superficie de la partícula Figura 19, así como también para la obtención de las proteínas Env solubles. Las VLPs se purificaron por ultracentrifugación con colchón de sacarosa al 20%, y posteriormente se caracterizaron utilizando diversas técnicas biofísicas, bioquímicas e inmunológicas, mostrando características similares a VLPs de retrovirus previamente reportadas.

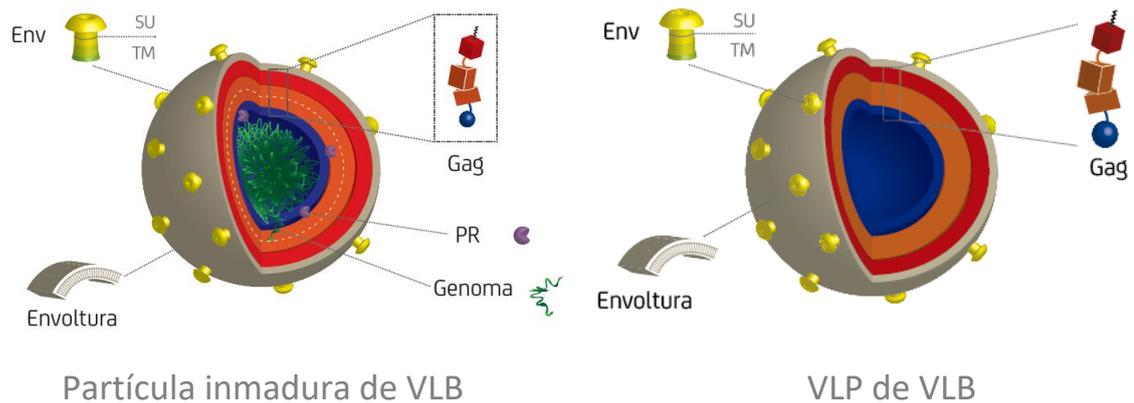


Figura 19. Representación esquemática de las VLPs de VLB.

Esquema de la partícula viral inmadura del VLB (izquierda) y una VLP formada por las proteínas Gag y Env del VLB (derecha). La partícula viral inmadura, contiene además de las proteínas Gag y Env, la proteína PR y el genoma viral, mientras que las VLPs, están formadas únicamente por las proteínas Gag y Env y carecen de genoma viral.

Por otra parte, se expresó y se purificó la glicoproteína Env y un mutante conteniendo mutaciones en el dominio de inmunosupresión (ISU) [168]. Ambas proteínas fueron caracterizadas mediante técnicas biofísicas y bioquímicas. Posteriormente se realizó la inmunización de ratones BALB/c con ambas proteínas con el fin de evaluar la respuesta inmune frente a las mismas y el efecto de las mutaciones en ISU. Se analizó la respuesta inmune humoral generada, mediante la determinación del título de anticuerpos IgG totales Env-específicos, por ELISA y la capacidad neutralizante mediante ensayo de inhibición de la formación de sincicios. Se analizó la respuesta inmune celular, mediante ensayo de proliferación *ex vivo* de los esplenocitos de los ratones inmunizados, con el fin de estudiar la proliferación de células T CD4+ y CD8+ y el perfil de citoquinas producido.

Por último, generamos dos líneas celulares reporteras de la infección por VLB. Este reportero utiliza la capacidad que tiene el LTR 5' de VLB de ser trans activado por la proteína TAX. De esta manera, la célula solo será capaz de expresar el gen reportero (en nuestro caso GFP) en presencia de partículas virales infectivas. Para ello, utilizamos un sistema lentiviral de segunda generación para la producción de pseudovirus, los cuales se utilizaron para la transducción de células CC81 o Vero, generando de esta manera, líneas estables reporteras. Este sistema reportero nos permitirá evaluar la infectividad de muestras biológicas, evaluar métodos de inactivación viral, así como también analizar un gran número de muestras en simultáneo, como por ejemplo sueros para determinar su capacidad neutralizante.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

Las secuencias nucleotídicas de origen viral fueron obtenidas a partir del ADNc genómico de una línea celular ovina persistentemente infectada con VLB (FLK-VLB-044, fetal lamb kidney cells, DSMZ N°ACC153). Todas las construcciones para la expresión de proteínas en células S2 de *D. melanogaster* fueron realizadas sobre el plásmido pT350 (cedido gentilmente por Felix Rey, Unidad de Virología Estructural, Institut Pasteur de París). El mismo es una modificación del plásmido pMT/BiP/V5-His (Invitrogen, CA, USA) [167]. El pT350 contiene el promotor metalotioneína (pMT) inducible por cationes divalentes Cd²⁺ o Cu²⁺, una señal de exportación BiP (péptido señal perteneciente a *D. melanogaster*) para la translocación de la proteína recombinante hacia el retículo endoplásmico (RE) e ingreso en la vía secretoria. Además, contiene un sitio de clivaje por enteroquinasa (EK) seguido de un doble strep-tag que permite la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad.

En nuestro laboratorio disponemos los siguientes plásmidos:

pT350EnvGE: Posee el gen env que abarca desde el aminoácido 33 hasta el 437 con codones optimizados para su expresión en *Drosophila*. El péptido señal de la proteína Env fue sustituido por el péptido señal BiP de *Drosophila* para la eficiente translocación de la proteína hacia el RE. Este plásmido está construido para expresar el Ectodominio de la proteína Env (ecto-Env). Por lo tanto carece del dominio transmembrana (TM) y la cola citoplasmática (CTD), que en conjunto llamamos fragmento TMCTD [168].

pT350EnvGEFm: Posee el gen de env que abarca desde el aminoácido 33 hasta el 437, con codones optimizados para su expresión en *Drosophila*, además tiene mutado el sitio de procesamiento proteolítico por furina, para obtener el ectodominio de la proteína Env (ecto-Env). El péptido señal de la proteína Env fue sustituido por el péptido señal BiP de *Drosophila*. A dicha construcción le falta el fragmento TMCTD [168].

A continuación, se describen las construcciones realizadas para la generación de las VLPs (**Figura 20**):

pMT/Gag: posee el gen que codifica la proteína Gag (1182 pb), abarcando desde el aminoácido 1 hasta el codón stop. Dicho gen fue clonado de manera tal de remover la secuencia señal BiP y dirigir la expresión de Gag hacia el compartimiento citosólico.

pMT/BiP/Envwt: gen que codifica el precursor de la glicoproteína Env (1452 pb). Para generar esta construcción se utilizó como molde el plásmido pT350EnvGE [168], al cual se le agregó el fragmento TMCTD optimizado para su expresión en *Drosophila*.

pMT/BiP/EnvFm: gen que codifica el precursor de la glicoproteína Env (1452 pb). Para generar esta construcción se utilizó como molde el plásmido pT350EnvGEFm [168], al cual se le agregó el fragmento (TMCTD) optimizado para su expresión en *Drosophila*.

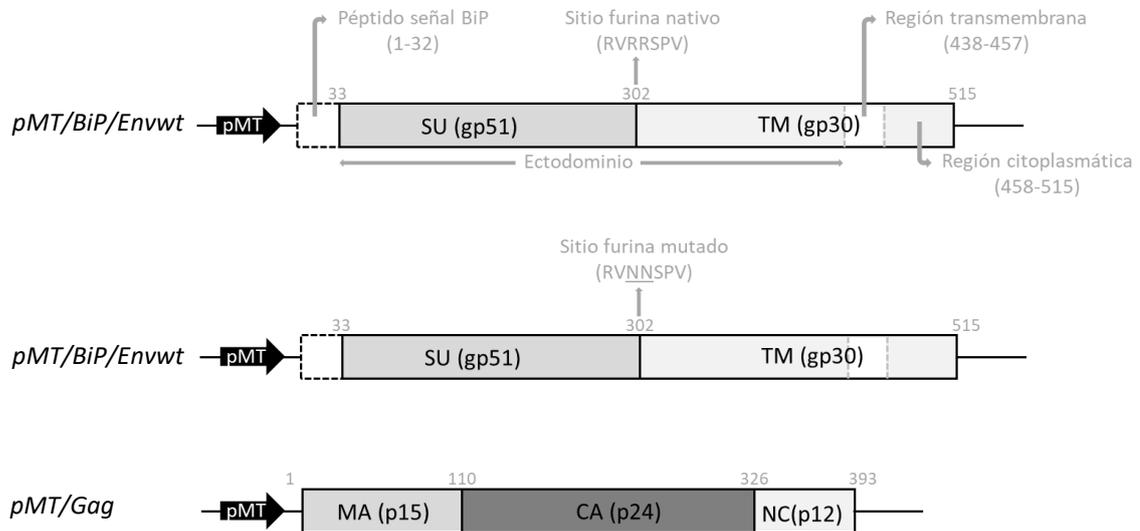


Figura 20. Esquema de las construcciones para la generación de las VLPs.

Para la construcción de las VLP-1 se diseñaron los plásmidos pMT/Gag y pMT/BiP/Envwt y para las VLP-2 los plásmidos pMT/Gag y pMT/BiP/EnvFm. Se señala el corte de furina nativo (RVRSPV) y el mutante (RVNSPV), el promotor de metalotioneína (pMT), el péptido señal de exportación (BiP), MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside).

Para la generación de la proteína soluble con el péptido ISU mutado se realizó la siguiente construcción (Figura 21):

pMT/BiP/ectoEnvFmlm: A partir de la construcción pT350EnvGEFm obtenida en [168], se realizaron las siguientes mutaciones puntuales en el péptido ISU. El péptido ISU nativo es **A¹Q²NR³RGLDWLYIRL** el cual se mutó en las posiciones 1, 2 y 4 rindiendo la secuencia **G¹A²NA³RGLDWLYIRL**. Estos aminoácidos han sido reportados como determinantes en la actividad inmunosupresora en otros retrovirus como HIV [54].

6.1.1 OPTIMIZACIÓN DE CODONES DEL FRAGMENTO TMCTD DEL GEN ENV (CEPA FLK-VLB)

De forma de obtener la construcción que exprese la proteína Env completa, el fragmento de ADN de 237 pb que codifica para el dominio TMCTD, fue optimizado en el uso de codones para su expresión en células S2 de *Drosophila melanogaster*. Este fragmento fue enviado a sintetizar a la empresa Genscript (USA, Inc). El plásmido generado por la empresa (pUCEnvTMCTD), fue reconstituído en H₂O, y utilizado para transformar bacterias DH5α electrocompetentes. El ADN plásmidico se purificó mediante miniprep utilizando un kit comercial (NucleoSpin® Plasmid, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG).

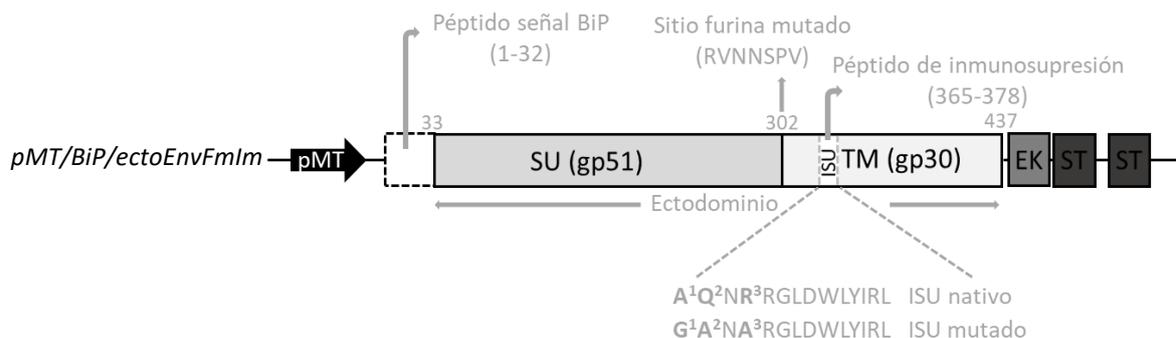


Figura 21. Esquema de la construcción para la generación de ectoEnvFmlm.

Se señala el corte de furina mutado (RVNNSPV), el promotor de metalotioneína (pMT), el péptido señal de exportación (BiP), el péptido de inmunosupresión (ISU), la subunidad gp30 sin TMCTD, el sitio de corte de enteroquinasa (EK) y el doble strep tag (ST).

6.1.2 DISEÑO DE PRIMERS

Los primers necesarios para clonar la proteína Gag en el plásmido pT350, se diseñaron en base a la secuencia de Gag de FLK-VLB (GenBank, número de acceso: EF600696) y de la secuencia del plásmido pT350. Se diseñaron primers en base a la secuencia de TMCTD con codones optimizados y los plásmidos pT350EnvGE y pT350EnvGEFm. Dichos primers serán utilizados para clonar el fragmento TMCTD por RF-cloning. Para introducir las mutaciones en el péptido ISU se diseñaron primers de tal forma de introducir los cambios en los aminoácidos 1, 2 y 4. Todos los primers fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.). Los primers fueron reconstituidos en H₂O de tal forma de obtener una solución stock a una concentración de 100 µM (Anexo I.12.1).

6.1.3 RF-CLONING

Todas las construcciones se realizaron mediante clonaje libre de enzimas de restricción (restriction free-RF-cloning). Para la síntesis de los megaprimers se empleó un volumen final de reacción de 50 µL: 10µL Phusion buffer GC 5x (Finnzymes), 1 µL dNTPs (10 mM), 2 µL de cada uno de los primers forward y reverse, 1 µL Phusion DNA polymerase (2U/µL), ADN molde 50 ng y H₂O hasta 50 µL. El ciclado utilizado fue: desnaturalización inicial a 98°C durante 3min y luego 35 ciclos de: desnaturalización a 98°C durante 30s, hibridación a 58-70 °C (dependiendo en cada caso del par de primers utilizados) durante 1min y extensión a 72°C durante 30s, y una extensión final a 72°C durante 10min. Los megaprimers se purificaron a partir de geles 1% de agarosa utilizando un kit comercial (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Los megaprimers purificados se emplearon en la segunda PCR, con volumen final 50 µL): 10 µL Phusion buffer HF 5x (Finnzymes), 1 µL dNTPs (10mM), 250ng del megaprimer, 1 µL Phusion DNA polymerase (2U/µL), 40 ng del plásmido donde se quiere clonar y H₂O hasta 50 µL. El ciclado utilizado fue:

desnaturalización inicial a 95°C durante 3min y luego 35 ciclos de: desnaturalización a 95°C durante 30 seg, hibridación a 58°C durante 1min y extensión a 72°C durante 5min (1min/kb máximo) y una extensión final a 72°C durante 10min. Posteriormente se realizó la digestión del ADN parental con 1 µL de DpnI (20U/µL -NEB) e incubó 1h a 37°C, e inactivó la enzima a 80°C durante 20 min. Un µL de la digestión se empleó en la transformación de 50 µL de bacterias DH5α electrocompetentes. El ADN plasmídico fue purificado mediante miniprep utilizando un kit comercial (NucleoSpin® Plasmid, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG).

6.1.4 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La mutágenesis dirigida para insertar las mutaciones en el dominio ISU se realizó por RF cloning. Se empleó un volumen final de reacción de 50 µL: 10 µL Phusion buffer GC 5x (Finnzymes), 1 µL dNTPs (10 mM), 0.5 µL de cada uno de los primers 10 µM (Anexo I. 12.1.3), 0.5 µL Phusion DNA polymerase (2U/ µL), ADN molde 40 ng y H₂O hasta 50 µL. El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C durante 30s y luego 18 ciclos de: desnaturalización a 95°C durante 30s, hibridación a 55 °C durante 1min y extensión a 72°C durante 5min, y una extensión final a 72°C durante 7min. Posteriormente se realizó la digestión del ADN parental con 1 µL de DpnI (20U/µL -NEB) e incubó 1h a 37°C, e inactivó la enzima a 80°C durante 20 min. Un µL de la digestión se empleó en la transformación de 50 µL de bacterias DH5α electrocompetentes. El ADN plasmídico fue purificado mediante miniprep utilizando un kit comercial (NucleoSpin® Plasmid, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG).

6.1.5 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS Y CONFIRMACIÓN DE SECUENCIA

Los plásmidos fueron amplificados mediante la transformación de 50 µL de bacterias quimiocompetentes DH5α mediante shock térmico (30min en hielo; 40s a 42°C; 5min en hielo) usando 2 µL de ADN plasmídico. La recuperación de las bacterias se realizó agregando 950 µL de medio LB incubando 1h a 37°C con agitación y se seleccionaron en placas de LB-agar suplementado con antibiótico de selección (ampicilina 100 µg/mL). Los plásmidos fueron purificados utilizando mini kits de purificación de ADN plasmídico según especificaciones del fabricante (NucleoSpin Plasmid Kit, Macherey Nagel) y la secuencia confirmada a través de servicios de secuenciación automática de ADN (Macrogen Inc, Corea). Las reacciones de secuenciación de ambas hebras se realizaron con los primers del plásmido pT350, MT-For y BHG-Rev. Las secuencias de ambas hebras obtenidas se revisaron manualmente y se editaron y alinearon usando el programa Vector NTI Advance 11, Thermo Fisher Scientific Inc (Anexo II). Una vez confirmadas las secuencias los plásmidos fueron propagados a escala midiprep utilizando un kit comercial (NucleoSpin® Plasmid, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG), de modo de tener suficiente cantidad de ADN plasmídico para las transfecciones.

6.2 GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES DE S2

Las células Schneider S2 (S2) de *Drosophila* fueron co-transfectadas con los plásmidos de interés junto con un plásmido que codifica un marcador de selección dominante. Los clones estables de S2 se obtuvieron mediante selección con antibiótico. Luego de la selección las células se adaptaron gradualmente a un medio libre de suero.

6.2.1 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS S2 CON EFFECTENE

Veinticuatro horas previo a la transfección, células S2 fueron sembradas a una densidad celular de 5×10^6 células por botella T25 (5 mL), y se crecieron a 28°C en medio Schneider's suplementado con 10% de SFB y 50 unidades de penicilina/50 ug de streptomicina por mL de cultivo.

Para la obtención de las VLPs se realizaron las siguientes co-transfecciones: 0,1µg plásmido pCoPuro (confiere resistencia a puromicina), 1µg de pMT/Gag y 1µg de pMT/BiP/EnvFm. Para el caso de las proteínas solubles se realizaron las siguientes co-transfecciones: 0,1µg del plásmido de pCoPuro y 1µg de pMT/BiP/ectoEnvFm o pMT/BiP/EnvFmIm.

Las diferentes transfecciones se realizaron usando el kit comercial Effectene Transfection Reagent (Qiagen), según indicaciones del fabricante. Pasadas 24hs, se removió el medio de transfección y se agregó medio de cultivo Schneider's nuevo suplementado con: suero fetal bovino (SFB) inactivado al 10% y medio condicionado* de las S2 parentales (sin transfectar). A las 72hs post-transfección se inició el proceso de selección mediante la adición de puromicina (concentración final 6 µg/mL). El cambio de medio se realizó cada 5 días y dos semanas luego de la transfección comenzó la amplificación de la línea celular transfectada. En ese momento también se inició la adaptación de las S2 a medio de cultivo libre de proteína (Insect Xpress medium, Lonza) el cual se realizó de forma gradual.

La propagación celular comenzó con botellas T25 (2 semanas y media), luego botellas T75 (1 semana) y finalmente botellas T150. En las T150 las células se mantuvieron hasta el inicio de los cultivos de alta densidad para la posterior inducción y expresión de la proteína. En este paso también comenzó el congelamiento de células para su almacenamiento utilizando 90% SFB/medio condicionado y 10% DMSO.

Para la propagación de células a alta densidad se sembraron las células S2 transfectadas con medio Xpress nuevo con puromicina (6 µg/mL) en frascos Erlenmeyer de 250mL a 25°C y con agitación (100rpm). La generación de líneas estables de S2 mediante este procedimiento llevó un período de 4 semanas aproximadamente.

*medio condicionado: medio de cultivo donde las células S2 parentales vienen creciendo, las células S2 requieren de determinados componentes presentes en este medio de cultivo para crecer.

6.3 CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA ESTABLE S2 PRODUCTORA DE VLPS

6.3.1 CINÉTICA DE INDUCCIÓN

El promotor pMT presente en el vector de expresión pT350, es un promotor de metalotioneína de *Drosophila melanogaster* el cual es inducible por la presencia de metales divalentes. Mediante el ensayo de cinética de inducción se evaluó la expresión de las proteínas Gag/Env (VLP-1) y Gag/EnvFm (VLP-2) a distintos tiempos post-inducción. Para este ensayo se sembraron $2,5 \times 10^5$ células S2 transfectadas por pocillo de una placa de 24 pocillos, las células se lavaron 2 veces con Xpress previo al sembrado de las mismas ($100 \times g$ durante 5 minutos). A los tiempos, antes de inducir ($t=0$ hr), y los días 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 11 post-inducción, las células se centrifugaron a $250 \times g$ durante 5 min. y para cada pocillo se separó pellet y sobrenadante y se almacenó a -20°C . Como control el mismo ensayo se realizó en ausencia de inductor. La evaluación de la expresión se realizó mediante SDS-PAGE/WB, empleando los anticuerpos monoclonales anti-p24 (VLB3, 1/2000) y anti-gp51 (VLB2, 1/2000) (VMRD, USA).

6.3.2 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN CÉLULAS S2 TRANSFECTADAS

Con el fin de evaluar la expresión intracelular de las proteínas Env y Gag en las líneas estables generadas y productoras de VLPS, se realizó una inmunofluorescencia indirecta. Para ello, $50 \mu\text{L}$ de cultivo de células de 7 días post-inducción fueron fijadas con una solución de formaldehído al 10% en PBS durante 30 min. El fijador se lavó 3 veces con PBS y posteriormente se bloqueó con PBS3%-Tritonx100 0,1% durante 15 min. Las células bloqueadas se incubaron durante 1 hr a TA con los anticuerpos anti-p24 (BLV-3, 1/200) y anti-gp51 (BLV-1, 1/500) (VMRD, USA). Se realizaron 3 lavados de 1 min con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario goat anti-mouse Alexa 594 (1/1000) junto con verde de metilo 1/5000 (marcaje de núcleo). Se incubó durante 1 hr a TA. La dilución de los anticuerpos se realizó en PBS-BSA 3%. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS y se realizó el montaje con glicerol 70% pH 8.8. Las muestras fueron analizadas con el microscopio confocal Leica TCS SP5.

6.3.3 CITOMETRÍA DE FLUJO

Mediante citometría de flujo se evaluó la expresión de Env en la superficie de células S2 (VLP-2) inducidas y sin inducir. A una densidad de 7.6×10^6 cél/mL se indujo la expresión con CdCl_2 $5 \mu\text{M}$ final. Células sin inducir se utilizaron como control. A las 30 hs post-inducción se tomó una alícuota de estas células y se procedió a su marcado. Para ello, se realizaron 3 lavados con buffer FACS (PBS-SFB 1%-Azida de sodio 0.05%) centrifugando a 2500 rpm por 2 min. Se separaron células para el control sin marcar y control de secundario. Se marcaron las células con el anticuerpo conformacional anti-gp51 (BLV-1, VMRD, USA) a una dilución 1/100 en buffer FACS por 30 minutos en hielo. Se realizaron 3 lavados y posteriormente se incubaron las células con un anticuerpo goat anti-mouse-Alexa594 a una dilución 1/500 en buffer FACS

por 30 minutos en hielo. Se realizaron 3 lavados. Las células sin fijar ni permeabilizar inmediatamente se analizaron en el citómetro Accuri C6. Los resultados se analizaron utilizando el software FlowJo.

6.4 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VLPS

6.4.1 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE VLPS

Las células transfectadas fueron cultivadas a 28°C en medio Insect-XPRESS. Para la producción a mayor escala de las VLPs, las células fueron cultivadas en frascos Erlenmeyer de 250 mL y cuando llegaron a una densidad celular de $7,5 \times 10^6$ cel/mL fueron inducidas con CdCl_2 a una concentración final de 5 μM . Siete días post-inducción, el cultivo fue recolectado y clarificado a 250 x g durante 5min. El sobrenadante obtenido fue filtrado por filtro de 0,45 μM . Las VLPs presentes en este sobrenadante fueron sedimentadas por ultracentrifugación a través de colchón de sacarosa al 20% (72000xg por 1,5 hs. a 4°C), resuspendidas en PBS, y almacenadas a -80°C (Figura 26.A).

6.4.2 SDS-PAGE/WB

Las VLPs producidas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 2 hr a 300 mA y 4°C. La membrana fue bloqueada en buffer de bloqueo (PBS-BSA3%) durante toda la noche a 4°C. La detección de la proteína Gag o Env se realizó mediante 1 hr de incubación a TA con anticuerpos monoclonales específicos anti-p24 (VLB-3, 1/2000) y anti-gp51 (BLV-2, 1/2000) (VMRD, USA). Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo de cabra anti-IgG murina conjugado con HRP (1/5000) (Santa Cruz), el cual fue incubado durante 1 hr a TA. Tanto los anticuerpos primarios como el secundario fueron diluidos en PBS-BSA3%-TWO.3%. Luego de cada incubación se realizaron 3 lavados de 5 min. cada uno con PBS-TWO.3%. Como revelador se utilizó el Kit ECL (Pierce) en el equipo Amersham ImageQuant 800 systems (Cytiva).

También se analizó la inmunoreactividad de sueros bovinos positivos para VLB frente a las VLPs, utilizando una dilución 1/500 de sueros bovinos negativos y positivos para VLB. Por otro lado también se emplearon sueros murinos policlonales generados contra las proteínas recombinantes p24 producida en *E.coli* o ectoEnv producida en células S2. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra anti IgG bovina conjugado con HRP (1/20000) (Sigma) o uno de cabra anti IgG murina conjugado con HRP (1/5000) (Santa Cruz), incubados durante 1 hr a TA.

6.4.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para caracterizar las VLPs desde un punto de vista estructural analizamos el pellet obtenido por ultracentrifugación en colchón de sacarosa mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y tinción

negativa. Las muestras se depositaron sobre grillas de cobre cubiertas con carbono/Formvar comerciales, se tiñeron con acetato de uranilo 1-3%, se lavaron con agua Milli-Q o KCl 0.1 M, y el exceso de líquido se removió mediante absorción con papel de filtro.

Por otra parte, para analizar el brotamiento de las VLPs desde las células transfectadas se realizaron cortes ultrafinos y se analizaron por MET. Un mL de cultivo de células S2 productoras de VLP-1 y VLP-2, fueron clarificados a 250xg durante 5 min. El pellet se fijó con 2.5% de glutaraldeído en buffer fosfato. Luego de la fijación, el pellet se lavó con buffer fosfato y se re fijó con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% y posteriormente se lavó. El proceso de deshidratación se realizó con sucesivos pasajes de alcohol de concentración creciente (etanol 25, 50, 70, 95 y 100%) y la posterior adición de una resina epóxica (araldita). Una vez polimerizada la resina se realizaron cortes semifinos (unos 300 nm) y cortes ultrafinos (unos 70 nm) en ultramicrotomo. Los cortes ultrafinos se levantaron en una grilla de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Estos ensayos se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, en un microscopio JEOL JEM-1010 operado a 80 kV.

6.4.4 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

Las VLPs purificadas fueron analizadas por Dispersión Dinámica de Luz (DLS por Dynamic Light Scattering) utilizando un equipo Zetasizer Nano S (Malvern Panalytical). Las muestras fueron pre incubadas a 25°C durante 10 min. en cubetas descartables de plástico (UVette, Eppendorf). La distribución de tamaños para cada muestra se obtuvo mediante el promedio de tres medidas analizadas con el software v.7.13 (Malvern Panalytical).

6.4.5 ESPECTROMETRÍA DE MASA (MS)

Las VLPs purificadas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y se tiñeron con azul de Coomassie. La fracción de gel correspondiente a los pesos moleculares entre 35-80 kDa se cortó en condiciones libres de queratina. Las proteínas se digirieron en gel con tripsina (grado de secuenciación Promega) a 37°C durante la noche. Las mezclas de péptidos extraídas del gel se desalaron utilizando microcolumnas (C18 ZipTip®, Merck, Millipore), se eluyeron en 60% de ACN / 0,1% de ácido fórmico, se secaron y se resuspendieron en 0,1% de ácido fórmico antes del análisis nano-LC MS / MS. Los péptidos trópicos se separaron usando un nano-HPLC (UltiMate 3000, Thermo Scientific) acoplado en línea con un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-Orbitrap (Q-Exactive Plus, Thermo Scientific). Se inyectaron mezclas de péptidos en una columna trampa (Acclaim PepMap 100, C18, Thermo Scientific) y se separaron en una columna PepMapTM RSLC C18 (2 μm , 100A, 75 μm ID, 50 cm de longitud) a un caudal de 200 nL / min. La elución se realizó usando el siguiente gradiente: 1% a 55% de B durante 86 min y 55% a 99% de B

durante 9 min con un caudal constante de 200 nl / min. (A: ácido fórmico al 0,1% en agua, B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (ACN)). El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de adquisición dependiente de datos con cambio automático entre exploraciones MS y MS / MS. Las exploraciones completas de MS se adquirieron a una resolución de 70K y las MS / MS se realizaron usando un método top12 dependiente de datos a una resolución de 17.5K usando una lista de exclusión dinámica. El análisis bioinformático de los datos obtenidos se realizó utilizando el software libre "PatternLab for Proteomics" v 4.0.0.84 (<http://patternlabforproteomics.org>). Se generó una base de datos utilizando *Drosophila melanogaster* UP000000803 de Uniprot (<https://www.uniprot.org>) 2018/10/31. Las secuencias teóricas de Gag, EnvFm y los 127 contaminantes más comunes se agregaron a la base de datos.

Los parámetros de búsqueda se establecieron de la siguiente manera: péptidos trípticos; oxidación de la glicosilación de Met y Asn (Hex3HexNAc2, Hex3HexNAc2dHex) como modificaciones variables; 10 ppm de tolerancia del precursor medido m / z. Las coincidencias del espectro de péptidos se filtraron utilizando el procesador de motor de búsqueda (SEPro) utilizando los siguientes parámetros; FDR aceptable: 1% a nivel de proteína.

6.5 EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ECTOENV Y ECTOENVIM

6.5.1 CINÉTICA DE INDUCCIÓN

Mediante el ensayo de cinética de inducción se evaluó la expresión de las proteínas ectoEnv y ectoEnvIm en el sobrenadante a distintos tiempos post-inducción. Para este ensayo se sembraron $2,5 \times 10^5$ células S2 transfectadas por pocillo de una placa de 24 pocillos, las células se lavaron 2 veces con medio Xpress previo al sembrado de las mismas en M24 (100×g durante 5 minutos). A los tiempos 31, 48 y 96 post-inducción las células se centrifugaron a 250×g durante 5 min. y para cada pocillo se separó pellet y sobrenadante y se almacenó a -20°C. Como control el mismo ensayo se realizó en ausencia de inductor. La evaluación de la expresión se realizó mediante SDS-PAGE/WB, empleando el anticuerpo monoclonal anti-gp51 (BLV-2, 1/2000) (VMRD, USA). Se evaluó también la expresión de la proteína Gag c/tag en la línea generada.

6.5.2 PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS ECTOENV Y ECTOENVIM

Las células S2 de alta expresión seleccionadas y adaptadas a medio libre de proteínas (Medio Xpress, LONZA) fueron crecidas a alta densidad previa a la inducción de la expresión de la proteína. Para la producción a mayor escala de la proteína, las células fueron cultivadas en frascos Erlenmeyer de 250 mL e inducidas con

CdCl₂ 5 μM con una densidad celular 7-7.5x10⁶ cel/mL. A las 30 hrs post-inducción el sobrenadante fue cosechado y centrifugado a 1500xg durante 30 min para remover restos celulares y posteriormente filtrado con filtro de 0,22 μm.

6.5.3 PURIFICACIÓN DE ECTOENVM Y ECTOENVMIM POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La purificación de las proteínas ectoEnv y ectoEnvIm se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad por interacción con el doble strep tag localizado en el extremo C-terminal de la misma. Para ello, se emplearon columnas StrepTrap™ HP (Streptactin superflow GE Healthcare) de 1 mL, según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el sobrenadante de cultivo previamente centrifugado y filtrado se le ajustó el pH a 8 con buffer Tris 1M pH 8.5. Posteriormente se cargó a la columna utilizando una bomba peristáltica con un flujo de 1mL/min. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna (VC) de buffer de unión (Tris 100 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1mM). La elución de la proteína se realizó en un paso único utilizando 6 VC empleando el buffer de unión conteniendo 2.5 mM de destiobiotina utilizando el equipo AKTA (Fast Performance Liquid Chromatography). Se recuperaron las fracciones correspondientes a sobrenadante crudo, flow through, lavados y eluato, las cuales fueron analizadas en geles de poliacrilamida 12% para SDS-PAGE tinción con Coomassie y SDS-PAGE/WB. La cuantificación de la proteína obtenida se realizó mediante espectrometría UV a 280nm.

6.5.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS SOLUBLES

6.5.4.1 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC)

Para determinar el estado oligomérico de las proteínas expresadas, se realizó una cromatografía de exclusión molecular en columna de alta performance Superdex 200 10/300 GL. Las condiciones de la SEC fueron 1 mL/min y la presión límite de la columna de 0.5 MPa. El buffer SEC utilizad contenía Tris 10 mM pH 8 y NaCl 150 mM. Las distintas fracciones colectadas se analizaron en geles de poliacrilamida 12% para SDS-PAGE tinción con plata.

6.5.4.2 SDS-PAGE/COOMASSIE

La expresión de las proteínas se evaluó mediante análisis por SDS-PAGE/Coomassie, en geles de poliacrilamida 12%.

6.5.4.3 ESPECTROMETRÍA DE MASA

La banda obtenida a partir de los geles de poliacrilamida 12%, fue cortada en condiciones libres de queratina y otras fuentes de contaminación. El análisis por MS (huella peptídica y espectros de fragmentación peptídica)

se realizaron utilizando el equipo 4800 MALDI TOF-TOF analyzer (Applied Biosystems, MDS sciex, USA) perteneciente a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo.

6.6 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A ECTOENVFM Y ECTOENVFMIM

6.6.1 INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/C

Los ensayos de inmunización se realizaron en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo.

Se utilizaron ratones BALB/c de 8 semanas de edad, los cuales se separaron en 3 grupos de 4 animales cada uno:

- 1) Grupo control: PBS + adyuvante
- 2) Grupo WT: 10 µg de proteína ectoEnv + adyuvante
- 3) Grupo MUT: 10 µg de proteína ectoEnvIm + adyuvante

La emulsión (proteína + adyuvante) se preparó en un volumen de 1 mL, siendo el volumen a inyectar al ratón de 50 µL distribuidos en 4 puntos por vía subcutánea (200 µL total). Se utilizó el adyuvante completo de Freund (SIGMA) para la primera inmunización e incompleto para los boosters posteriores. Luego de la primera inmunización, se realizaron 3 estímulos subsiguientes separados por 4 semanas cada uno. Los ratones se sangraron previo a la primera inmunización y 7 días después de la misma, y luego de cada booster mediante punción de vena submandibular (Figura 35). Una vez tomada la muestra se guardó toda la noche a 4°C y posteriormente se centrifugó y separó suero. El suero fue almacenado a -20°C.

6.6.2 ANALISIS DE LA RESPUESTA HUMORAL

6.6.2.1 DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS

La evaluación de la respuesta humoral se realizó mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA), puesto a punto previamente en nuestro laboratorio [169]. Brevemente, microplacas de ELISA de 96 pocillos (Nunc, Denmark) se sensibilizaron durante toda la noche a 4°C con 2.5 µg/mL de proteína ectoEnv por pocillo, previamente diluida en buffer carbonato/bicarbonato pH9. El bloqueo de la placa se realizó con PBS-leche 3%-Twen20 0.2% durante 1 hr a 37°C. Los lavados se realizaron con PBS-Tw20 0,2% (3 veces) utilizando un lavador de microplacas automático (Thermo Scientific). Se incubaron 100 µL de la dilución de los sueros provenientes de los ratones (1/5000) durante 1 hr a 37°C y diluidos en PBS-leche 3%-Twen20 0.2%. Se repitió el mismo esquema de lavado y los pocillos se incubaron con 100 µL del conjugado anti-ratón HRP (1:5000) diluido en PBS-leche 3%-Twen20 0.2% durante 1 hr a TA. Se lavó la placa 3 veces con PBS-Tw20

0,2% y se reveló con el sustrato TMB (Sigma). EL desarrollo de color se detuvo empleando H₂SO₄ 3N y se midió la absorbancia a 450 nm (Multiskan FC Microplate Reader Thermo Scientific).

6.6.2.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE LOS ANTICUERPOS OBTENIDOS

Para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos obtenidos, es decir para saber si los anticuerpos son neutralizantes o no, se puso a punto un ensayo de inhibición de formación de sincicios. El ensayo de inhibición consiste en cultivar las células FLK “donadoras” con los sueros problema y luego mezclarlas con las células “aceptoras”, las CC81 o las VERO.

6.6.2.2.1 Formación de sincicios mediante co-cultivo de FLK y CC81

Este ensayo se basa en la capacidad que tiene la glicoproteína Env de VLB de fusionarse y dar lugar a células multinucleadas (sincicios). El ensayo consistió en co-cultivar la línea FLK-VLB persistentemente infectada a la cual llamamos célula “donadora” de factor de fusión, y una línea celular que llamamos “aceptora” de factor de fusión, para tal caso evaluamos la línea celular CC81 y la línea celular VERO.

Para la puesta a punto del ensayo se evaluaron distintas relaciones de célula donadora: célula aceptora, FLK:CC81 y FLK:VERO en la relaciones 1:4, 1:2 y 1:1, según lo descrito por Domenech *et al.*, [74]. Las células fueron co-cultivadas en medio DMEM suplementadas con 10% SFB y crecidas a 37°C y 5% de CO₂. A las 24 hrs de co-cultivo se observaron las células al microscopio óptico (NIKON, Modelo TS-100 LED). Se define sincicio toda célula multinucleada con más de 4 núcleos.

6.6.2.2.2 Observación de sincicios mediante tinción con Giemsa

Pasadas las 24 hr de co-cultivo, se retiró el medio, se lavó la monocapa con PBS y las células se fijaron con metanol absoluto frío durante 10-15 min. Se retiró el metanol y se agregó Giemsa al 10% en PBS y se lo dejó incubando durante 10 min. Se realizaron 3 lavados con H₂O y se lo dejó secar

6.6.2.2.3 Observación de sincicios mediante Microscopía confocal

Se sembraron células FLK y CC81 en una relación 1:4, sobre una placa conteniendo cubre objetos previamente tratados con HCl 6N. A las 24 hrs del co-cultivo, se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con formaldehído al 4% durante 15 min. Se realizaron 3 lavados con PBS. Posteriormente se agregó una mezcla de Faloidina para marcar la actina filamentosa (1/500) y verde metilo para marcar el núcleo (1/5000) preparados en PBS, BSA 3%, Tritón-X100 0.1% y se incubó durante 1 hr a TA. Se realizaron 3 lavados con PBS. El montaje se realizó con glicerol 70% pH 8.8, y se guardó a -20°C hasta su visualización. Se utilizó el microscopio confocal Leica TCS SP5 y las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ.

6.6.2.2.4 Observación de la formación de sincicios in vivo-Time lapse

Para observar la fusión in vivo entre las células FLK y CC81 se realizó un time lapse. Para ello, células FLK se incubaron con los colorantes H33342 1/1000 (marca núcleo) y DiO 1/2000 (marca membrana) durante 20 min a 37°C. Células CC81 se incubaron con los colorantes AO 1/2020 (marca núcleo) y con Dil 1/5000 (marca

membrana). Luego de la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS y finalmente las células se resuspendieron en medio de cultivo, se mezclaron en una relación 1FLK:4CC81 y se sembraron en la placa. A las 12 hrs de co-cultivo se comenzaron a sacar fotos cada 10 min, tomando 10 campos por pocillo. Se deja 21 hrs.

6.6.2.2.5 *Inhibición de la formación de sincicios*

La puesta a punto se realizó con sueros de bovinos positivos para VLB (por una cuestión de volumen de suero). Los sueros fueron de complementados mediante incubación a 56°C durante 1 hr. Posteriormente se incubaron las células FLK con los sueros problemas durante 1 hr a 37°C. Se realizaron diluciones de los sueros por triplicado (1/5,1/10,1/20,1/40,1/80) [170]. Luego la mezcla FLK-suero se incubó con células CC81 o VERO durante 24 hr a 37°C. A las 24 hrs de co-cultivo se realizó una tinción con Giemsa. Se consideraron sincicios los que tenían un número mayor a 4 núcleos. Se realizó el cálculo del % de inhibición de la formación de sincicios (%SI) como $(1 - (\text{promedio N}^\circ \text{sincicios pocillos con suero} / \text{promedio de N}^\circ \text{sincicios pocillos sin suero})) \times 100$ [170].

6.6.3 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

6.6.3.1 *ENSAYO DE PROLIFERACIÓN EX VIVO DE CÉLULAS T*

Los bazos de los ratones inmunizados fueron recuperados en PBS-EDTA estéril (PSE) y depositados sobre un filtro donde fueron disgregados con un émbolo de jeringa, enjuagando con PSE. Se centrifugó a 4°C durante 5 min. a 400xg, se descartó el sobrenadante y se agregó 5 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos durante 10 min. a TA. Se agregó PSE y se centrifugó a 4°C durante 5 min. a 400xg y se realizó otro lavado con PSE. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de esplenocitos en 5 mL de PSE. Se filtró por 100 µm y se contaron las células.

Para el ensayo de proliferación, los esplenocitos se resuspendieron en 3 mL de PBS (sin suero) y se les agregó 1 µL de DDAO, se mezcló y se dejó incubar por 10 min. a TA. Se bloqueó la reacción con 1,25 mL de SFB y se centrifugó inmediatamente a 400xg 5 min. a 4°C. Se lavó 2 veces con medio completo, se contaron las células y se llevaron a una dilución de 2 millones de células/mL en medio completo. Se depositó 100 µL de la dilución por pocillo en placa de 96 con fondo en U. Luego se agregó 100 µL de ectoEnv a las concentraciones 0, 1, 10, 20, 50 y 100 µg/mL y para la condición Concanavalina A (ConA) se agregó 2.5 µL. También se incluyó en la placa células sin DDAO. La placa se incubó durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂.

Luego de este tiempo, se recuperaron las células y se pasaron a una placa de citometría. Se centrifugó a 2500 rpm por 2 min., y se guardaron 150 µL del sobrenadante a – 20°C (para la determinación de citoquinas). Se centrifugó nuevamente la placa, se descartó el sobrenadante restante. Las células se resuspendieron en 10 µL de un mix de TCR-FITC 1/1000 y CD4-PECy7 1/1000 en PSE, de manera de poder seleccionar las células

TCR+/CD4+ (células T CD4+) y las TCR+/CD4- (células T CD8+). Los pocillos se marcaron con single stain y se dejó un control sin stain. Se incubó 30 min. en hielo protegido de la luz. Se lavó 2 veces con PSE se resuspendió en 200 μ L y se pasó a tubo de citómetro.

6.6.3.2 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS

Los niveles de citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo del experimento de proliferación de linfocitos T, se evaluaron mediante el uso del Kit LegendPlex Mouse Inflammation Panel, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este kit permite la cuantificación simultánea de 13 citoquinas de ratón, incluidas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1, IFN- β , IFN- γ , TNF- α y GM-CSF. Este panel de ensayo proporciona sensibilidades de detección más altas y rangos dinámicos más amplios que los métodos ELISA tradicionales. Las medidas fueron tomadas en el citómetro BD Accuri C6 y realizadas por la Unidad de Biología Celular (UBC) del Institut Pasteur de Montevideo.

6.7 GENERACIÓN DE UNA LÍNEA REPORTERA DE LA INFECCIÓN POR VLB

6.7.1 INFECCIÓN DE CÉLULAS VERO Y CC81 CON VLB

El día antes a la infección se sembraron 3×10^5 células VERO o CC81 por pocillo de una placa de 6 pocillos, para tener una confluencia del 80-90% a las 24 hrs. Al día siguiente, el medio de cultivo fue removido y cada pocillo se lavó con 2 mL de DMEM. Luego del lavado se agregó 1 mL del “inóculo viral” (sobrenadante de la línea celular FLK-VLB o BL3.1) o medio en caso de los controles negativos. Se dejó adsorber durante 1 hr a 37°C. En algunos casos se retiró el inóculo y fue remplazado por medio de infección (DMEM suplementado con 1% SFB), y en otros casos se dejó el inóculo y se completó con medio de infección. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂.

Para la obtención de partículas virales de VLB el sobrenadante de 5 días de cultivo de células FLK-VLB o BL3.1 fue colectado y centrifugado durante 5 min. a 3000 rpm para remover los debris celulares. El sobrenadante obtenido fue filtrado por filtro de 0,22 μ m, alicuotado de a 1 mL y guardado en nitrógeno líquido hasta su uso.

6.7.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE CÉLULAS INFECTADAS

Se sembraron 3×10^5 células/pocillo de células Vero o CC81 y se incubaron durante 24 hrs. Se retiró el medio de crecimiento y se agregó 1 mL de inóculo viral (sobrenadante de FLK-VLB o BL3.1) y se lo dejó adsorber durante 1 hr a 37°C. A la hora se agregan 2 mL de medio de propagación viral y se incubó a 37°C. A los 7 p.i se raspan las monocapas y se toman 500 μ L de la suspensión celular. La extracción del ADN

celular se realizó utilizando el Kit Pure Link Genomic DNA mini kit (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. El ADN fue eluído en 50 μ L de H₂O ultrapura (Invitrogen) y cuantificado por Nanodrop.

6.7.3 PCR DE ADN PROVIRAL

El protocolo de PCR fue ajustado de acuerdo con las indicaciones del proveedor de la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen), así como las condiciones del ciclado. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo una mezcla de: 1x Taq buffer 10X, 1.5 μ L MgCl₂ 50mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1.5 μ L de cada oligonucleótido, 0,25 μ L de Taq ADN polimerasa (50U/ μ L) y 50 ng de ADN. Las condiciones de la amplificación fueron: 94°C durante 2 min., 30 ciclos de 95°C durante 30 seg., 60 durante 30 seg., 72°C durante 1 min. y 72°C durante 4 min. Cinco μ L del producto de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % con bromuro de etido. En la PCR se incluyeron los siguientes controles: 1) control de extracción, para el cual se amplificó parte del gen de la GAPDH, 2) controles de sobrenadantes utilizados como inóculos para analizar la presencia de restos de ADN de las células FLK-VLB o BL3.1 que pudieran ser fuente de contaminación y por eso de positiva la PCR, 3) controles de reactivos, para el cual se utilizó H₂O.

6.7.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES EN CÉLULAS VERO INFECTADAS

En una placa de 6 pocillos se sembraron 3x10⁵ células Vero/pocillo conteniendo cubreobjetos previamente tratados con HCl 6 N. A las 24 hrs., se retiró el medio de crecimiento y se agregó 1 mL de inóculo (sobrenadante de FLK-VLB) y se lo dejó adsorber durante 1 hr. Sin retirar el inóculo viral, se agregó 2 mL de medio de propagación viral. A las 24 hrs pi las células se fijaron con formaldehído 4%, y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS. Las células se bloquearon y permeabilizaron con PBS BSA3%-Triton-X100 0,1% durante 15 min., y se incubaron durante 1 hr a TA con los anticuerpos anti-p24 (BLV-3, 1/200) y anti-gp51 (BLV-1, 1/500) (VMRD, USA). Se realizaron 3 lavados de 1 min con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG murina Alexa 594 (1/1000) junto con Hoescht 33342 1/5000 (marcaje de núcleo). Se incubó durante 1 hr a TA. La dilución de los anticuerpos se realizó en PBS-BSA 3%. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS y se realizó el montaje con glicerol 70% PH 8.8. Las muestras fueron analizadas con el microscopio confocal Leica TCS SP5.

6.7.5 PLÁSMIDOS LENTIVIRALES DE SEGUNDA GENERACIÓN

En el laboratorio contamos con el sistema lentiviral de segunda generación para la producción de pseudovirus (PVs) (partículas virales no replicativas) (**Figura 22**). Este sistema está constituido por tres plásmidos: 1) **plásmido de empaquetamiento** que codifica los genes Gag, Pol, Rev y Tat; 2) **plásmido de transferencia** (reportero en nuestro caso), contiene los LTR virales y la señal de empaquetamiento Ψ (psi). A menos que se proporcione un promotor interno (en nuestro caso CMV), la expresión génica está dirigida

por el 5'LTR, que es un promotor débil y requiere la presencia de Tat para activar la expresión. 3) **Plásmido de envoltura**. El tropismo lentiviral está determinado por la capacidad de la proteína de la envoltura viral para interactuar con los receptores en la superficie de la célula blanco. La proteína de envoltura G de VSV (VSV-G) se usa comúnmente en la producción de partículas lentivirales porque confiere un amplio tropismo en una variedad de especies y tipos de células [171]. Este sistema tiene la característica de transducir células tanto en división como sin división, además de que presenta la ventaja de que el lentivirus se integra de manera estable en el genoma de la célula transducida, lo que permite la expresión del transgén a largo plazo.

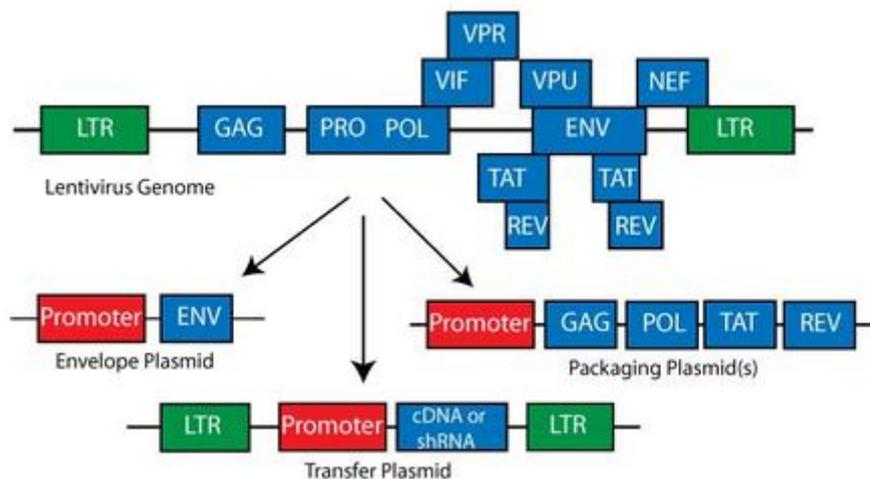


Figura 22. Plásmidos Lentivirales de Segunda Generación.

Fuente: <https://www.addgene.org/guides/lentivirus/#second-generation>.

En nuestro laboratorio disponemos de los siguientes plásmidos:

- 1) Plásmido reportero o transferencia (CMVGFP):** Este plásmido contiene el gen reportero para la expresión de GFP bajo el promotor de citomegalovirus (CMV). Sobre este plásmido se sustituyó el promotor CMV por el 5'LTR de VLB. Este plásmido fue generado en una pasantía en nuestro laboratorio por la Dra. Francesca Di Nunzio del Institut Pasteur de Paris.
- 2) Plásmido de empaquetamiento (Lenti DR8.74):** contiene las secuencias de Gag, Pol, Rev, and Tat (Addgene#22036).
- 3) Plásmido de envoltura (pMD2.G):** contiene el gen para la expresión de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Addgene#12259).

Los principales riesgos que deben tenerse en cuenta en el uso de vectores lentivirales son la posibilidad de generación de lentivirus con capacidad replicativa y el potencial de oncogénesis (que depende el gen que se transfiere). Estos riesgos pueden mitigarse por la naturaleza del sistema de vectores utilizado (y sus características de seguridad) y por la naturaleza del inserto codificado por el vector. Otro factor a tener en cuenta es el tipo de proteína de envoltura heteróloga utilizada, en particular el uso de la proteína G de VSV, la cual puede ampliar la tropismo celular y tisular de los vectores lentivirus, también debe considerarse como factor de riesgo.

En términos de diseño de vectores, los sistemas lentivirales de segunda y tercera generación separan los componentes de transferencia, envoltura y empaquetamiento del virus en diferentes vectores. El vector de transferencia codifica el gen de interés y contiene las secuencias que se incorporarán al genoma de la célula huésped (LTRs), pero no puede producir partículas virales funcionales sin los genes codificados en la envoltura y los vectores de empaquetamiento. A menos que se produzca una recombinación entre los vectores de empaquetamiento, envoltura y transferencia, y la construcción resultante se empaquete en una partícula viral, no es posible que los virus producidos normalmente a partir de estos sistemas se repliquen y produzcan más virus después de la infección inicial. En este sentido, los sistemas de tercera generación se consideran más seguros que los de segunda generación porque el vector de empaquetamiento se ha dividido en dos plásmidos separados (lo que da como resultado un sistema de cuatro plásmidos en total). Además, los sistemas de tercera generación no utilizan la proteína Tat del VIH para producir virus de longitud completa a partir del vector de transferencia durante la etapa de producción viral. En cuanto al nivel de contención apropiado para la manipulación de este tipo de sistemas: los requerimientos apropiados son de uso de laboratorio BSL2 o BSL2+, equipo de protección personal apropiado, protección de mucosas, y desinfección con ETOH 70% (Fuente: https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/2014/01/Lenti_Containment_Guidance_0.pdf).

6.7.6 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK293T PARA LA OBTENCIÓN DE PSEUDOVIRUS LENTIVIRALES

En la **Figura 23** se muestra un esquema de la producción de PVs mediante la co-transfección de células HEK293T con los plásmidos: LVLTRVLBGFP o LVCMVGFP, DR8.74, VSV-G. Se obtuvieron dos tipos de PVs: 1) LVLTRVLBGFP, el cual contiene el gen reportero GFP bajo el LTR de VLB (Long terminal repeat), y 2) LVCMVGFP, el cual contiene la GFP bajo el promotor de CMV. Ambos tipos de PVs contienen en su superficie la proteína de membrana G del virus de la estomatitis vesicular (VSV).

El día previo a la transfección se sembraron $2,5 \times 10^6$ células HEK293T en placas de Petri con 10 mL de medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomicina. La transfección se realizó con PEI 1mg/mL (Polysciences), según recomendaciones del fabricante. Se utilizó una relación de ADN:PEI de 1:10, utilizando las siguientes cantidades de plásmidos: 10 μ g de LVLTRVLBGFP o LVCMVGFP, 6.5 μ g de DR8.74 y 3.5 μ g de VSV-G. A las 12-18 hrs post-transfección, se removió el medio de transfección y se agregó medio nuevo. A las 48hrs post transfección, se colectó el sobrenadante y se filtró por 0.45 μ m. Se alicuotó de a 1 mL y se guardó a -80°C .

6.7.7 TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS VERO Y CC81 CON PVS LTRVLBGFP, PARA LA GENERACIÓN DE LA LÍNEA REPORTERA

El día antes de la transducción se sembraron 0.5×10^5 células (Vero, CC81 y FLK) por pocillo de una placa 24 pocillos, para que a las 24 hrs estén aproximadamente en un 70% de confluencia. Para la transducción, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se agregó 250 μ L de PVs (LTRVLBGFP o CMVGFP) a cada pocillo excepto a los pocillos control negativo. Se agregaron 250 μ L de medio y 10 μ L de poliberno (250 μ g/mL). Se incubó la placa a 37°C y CO_2 durante 60 hrs. La placa se observó en el microscopio de epifluorescencia, y se tomaron imágenes, las cuales fueron analizadas con el programa ImageJ.

Posteriormente, las células se sub cultivaron y se pasaron a una placa de mayor superficie (p35) para expandir el cultivo para continuar con los experimentos, así como también para congelar las líneas generadas con bajos pasajes (p3).

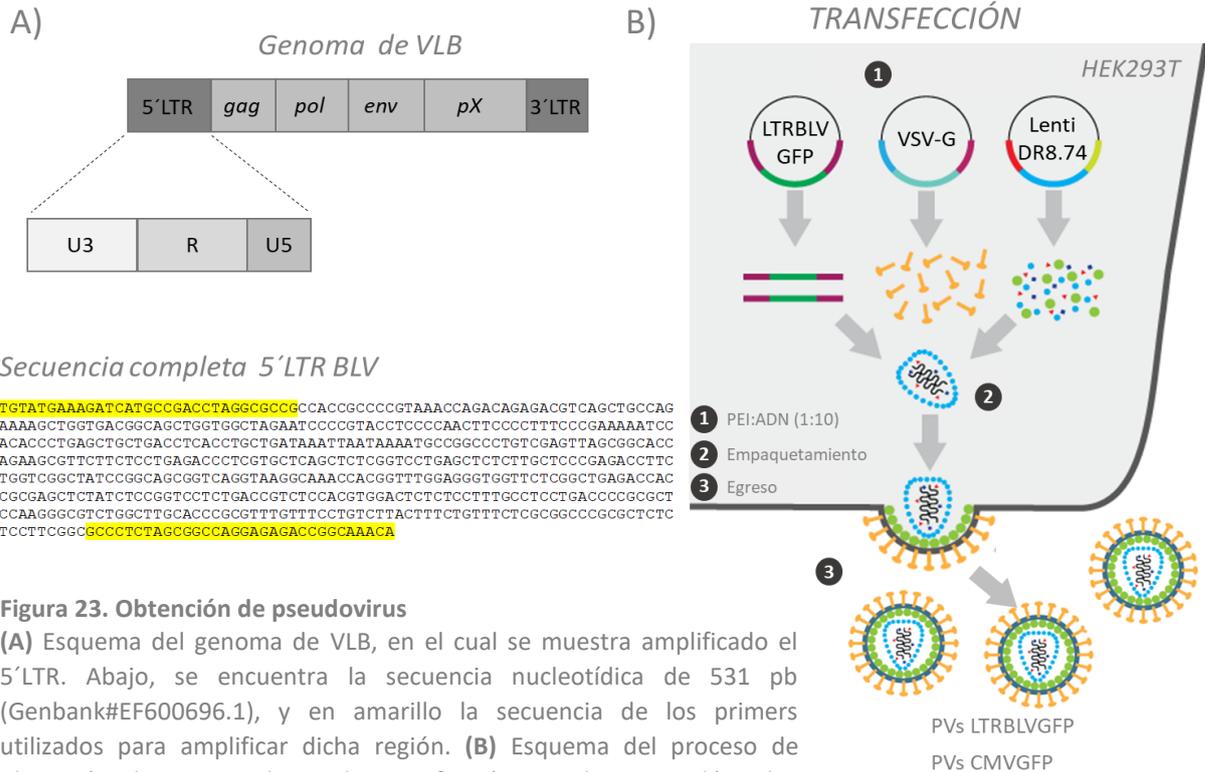


Figura 23. Obtención de pseudovirus

(A) Esquema del genoma de VLB, en el cual se muestra amplificado el 5'LTR. Abajo, se encuentra la secuencia nucleotídica de 531 pb (Genbank#EF600696.1), y en amarillo la secuencia de los primers utilizados para amplificar dicha región. (B) Esquema del proceso de obtención de PVs mediante la transfección con los tres plásmidos lentivirales de células HEK293T. Luego de la transfección con PEI (1) se expresan las proteínas lentivirales (LentiDR8.74), la proteína G de VSV (VSV-G) y se transcribe el ARNsh que contiene el gen reportero, y se empaquetan (2), para luego egresar de la célula (3) por brotamiento. Este proceso se realizó para la obtención de los PVsLTRVLBGFP y para PVs CMVGFP (control).

6.7.8 EVALUACIÓN DE LA LÍNEA REPORTERA MEDIANTE LA INFECCIÓN CON VLB

Se realizó un co-cultivo entre las células reporteras (Vero o CC81) y células productoras de virus FLK en distintas relaciones FLK:reportera (1:1, 1:2, 1:4). El co-cultivo se incubó durante 48 hrs a 37°C y CO₂. La expresión de GFP se analizó por microscopia de epifluorescencia y las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ. Por otro lado, la expresión de GFP se evaluó mediante citometría de flujo. Luego de tomadas las imágenes, las células se lavaron con PBS y se despegaron con tripsina. Luego de neutralizada la tripsina mediante el agregado de medio completo, las células se pasaron a una placa de fondo V. Se realizaron dos lavados con PBS-BSA3%, centrifugando la placa a 450xg por 2 min. Posteriormente las células se fijaron mediante el agregado de PFA% e incubación durante 10 min en hielo. Se agregó PBS-BSA1% y se centrifugó la placa a 450xg por 2 min. Las células se pasaron a tubos para su adquisición en el citómetro de flujo FACS Aria Fusion. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software FlowJo.

6.8 LÍNEAS CELULARES

S2

Las células S2 fueron descongeladas en medio Schneider suplementado con 1% penicilina-estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, USA) inactivado. Los cultivos fueron incubados en estufa a 28°C en ausencia de CO₂. Las células se subcultivaron cada vez que la densidad celular alcanzó 10-20x10⁶ células/mL y siempre se mantuvo parte del medio condicionado durante el pasaje celular.

Vero

Línea celular derivada de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), con características de células epiteliales y adherentes (número de ATCC: CCL-81). Dichas células fueron crecidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-high glucose, GlutaMAX (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco, USA) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco)

CC81

Línea celular derivada de riñón felino, con características de células fibroblásticas y adherentes (número de ECACC: 90031403). Dichas células fueron crecidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-high glucose, GlutaMAX (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco, USA) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco).

HEK293T

Línea celular derivada de riñón embrionario humano, con características de células epiteliales y adherentes (número de ATCC: CRL-3216). Dichas células fueron crecidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-high glucose, GlutaMAX (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco, USA) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco).

FLK-VLB

La línea celular FLK-VLB proviene de células de riñón de cordero fetal que posee integrado el ADN proviral de VLB (cepa belga) como resultado de la transformación de un cultivo primario para el establecimiento de la línea celular transformada. Esta línea celular fue crecida en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), suplementado con L-glutamina (2mM), 1% penicilina/estreptomicina, 1% piruvato de sodio, HEPES (10mM) y 10% de SFB inactivado (Gibco, USA) (Inactivación en baño de agua durante 1hr a 56°C).

BL3.1

La línea celular BL3.1 (ATCC: CRL-2306) generada por irradiación, proviene de un linfoma de linfocitos B bovinos. Estas células son una variante que no expresa MHC clase I pero que tiene una alta

expresión de MHC clase II y producen activamente VLB. Esta línea celular fue crecida con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), suplementado con L-glutamina (2mM), 1% penicilina/estreptomicina y 10% SFB (Gibco, USA). Esta es una línea en suspensión por lo tanto la propagación de la línea se realizó mediante centrifugación a 1200 rpm, resuspendiendo las células mediante pipeteo en medio de cultivo nuevo a una densidad celular de 5×10^5 células viables/mL. El mantenimiento del cultivo puede realizarse sin centrifugación mediante el agregado de medio fresco; la concentración celular debe estar en un rango de 5×10^5 - 2×10^6 células viables/mL.

Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C en estufa con saturación de CO₂ al 5%. La propagación de las líneas celulares, excepto la BL3.1, se realizó empleando una solución de tripsina-0,05% EDTA. Todas las líneas celulares fueron almacenadas en nitrógeno líquido (-196°C) en una mezcla 9:1 de SFB y DMSO.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VLPS DE VLB

7.1.1 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ENVWT, ENVFM Y GAG EN CÉLULAS S2 DE *DROSOPHILA*

Uno de los principales objetivos de esta tesis fue producir dos tipos de VLPs, una que presentara en la superficie la proteína Env con el sitio de corte por furina en estado nativo y la proteína Gag (VLP1), y otra que presentara la proteína Env con el sitio de corte por furina mutado, y la proteína Gag (VLP2). Para ello, utilizamos un sistema de expresión eucariota basado en células Schneider 2 (S2) de *Drosophila melanogaster*. Estas células pueden ser fácilmente transfectadas para generar líneas estables y han sido ampliamente usadas para la expresión de glicoproteínas virales, ya sea secretadas o unidas a membrana [172], [173]. La presencia de la maquinaria para el correcto plegamiento el cual promueve la formación de enlaces disulfuro en el RE y la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales, tales como la N-glicosilación, lo hacen un buen sistema para la expresión de glicoproteínas [174]. Otra característica interesante de este sistema de expresión es la capacidad de integrar múltiples plásmidos en su genoma, entre 500 a 1.000 copias de plásmido son capaces de insertarse “cabeza-cola” en un solo evento. Esto permite altos niveles de expresión de la proteína de interés, así como del gen de resistencia utilizados para la selección [175]. El plásmido de expresión contiene al péptido señal BiP perteneciente a *Drosophila* que sustituye el péptido señal de VLB permitiendo una eficiente translocación de la glicoproteína Env naciente hacia el retículo RE de la célula transfectada y su posterior inserción en la membrana celular.

En nuestro laboratorio se disponía de los plásmidos pT350EnvGE y pT350EnvGEFm, a partir de los cuales se expresa el ectodominio de la proteína Env con el sitio furina nativo (ectoEnv) y con el sitio furina mutado (ectoEnvFm) [168]. Estos plásmidos fueron empleados como esqueleto para la generación de las proteínas de largo total, Envwt y EnvFm, mediante el clonado del fragmento TMCTD, imprescindible para el correcto anclaje de la proteína Env en la membrana de las células transfectadas y posterior incorporación en VLPs. Por otra parte, se clonó también la secuencia para la expresión de la proteína Gag. Todos los clonajes se realizaron mediante RF-cloning. Una vez generadas las construcciones y confirmadas sus secuencias (**Anexo II, 13.1**), los plásmidos se propagaron a gran escala en bacterias DH5 α , de manera tal de obtener una cantidad suficiente de ADN plasmídico para la transfección.

Las líneas estables que producen las diferentes VLPs, se generaron mediante la co-transfección de células S2 con los plásmidos pMT/Gag y pMT/BiP/Envwt o pMT/BiP/EnvFm, para expresar las proteínas Gag y Envwt o EnvFm, respectivamente (**Figura 18**). El proceso de selección de cada línea fue llevado a cabo en medio

Schneider's conteniendo SFB y puromicina. Las células fueron propagadas y adaptadas gradualmente al crecimiento sin suero en un medio de cultivo libre de proteínas (Insect Xpress). Al cabo de aproximadamente 4 semanas se obtuvieron dos líneas estables policlonales, Gag/Envwt-S2 y Gag/EnvFm-S2 para producir VLPs de VLB, que llamamos VLP1 y VLP2, respectivamente.

Con el fin de ver si los plásmidos conteniendo los genes *gag* y *env* se integraron en el genoma de las líneas generadas, se realizó la extracción del ADN genómico y amplificación por PCR de una secuencia parcial de ambos genes. Como resultado, se logró amplificar la secuencia parcial de los genes *env* y *gag* (**Anexo II. Figura S 1**). Si bien las líneas generadas son policlonales y por lo tanto tal vez no todas las células contienen en su genoma a la vez los genes *gag* y *env*, el resultado obtenido confirma que la transfección e integración ocurrió efectivamente.

La expresión de las proteínas Gag, Envwt y EnvFm se confirmó mediante western blot en condiciones de reducción en el sobrenadante del cultivo a los días 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 11 post inducción con CdCl₂.

Para el caso de Envwt, una banda de tamaño entre 35-55 kDa fue detectada con el anticuerpo monoclonal BLV2 el cual reconoce el epítipo lineal D presente en la subunidad gp51 (**Figura 24 A**). Este resultado está de acuerdo con el resultado esperado de procesamiento proteolítico de Envwt por endopeptidasas de tipo furina celulares, el cual da lugar a las subunidades gp51 (aprox. 40 kDa) detectada por el anticuerpo BLV2, y la subunidad gp30 (aprox. 24 kDa) no detectada por este anticuerpo. Se puede apreciar también que con el tiempo (día 5) comienzan a aparecer productos de degradación.

Por otro lado, el anticuerpo monoclonal BLV2 detecta una banda del tamaño esperado para la proteína EnvFm de largo total aproximado de 65 kDa, en el sobrenadante de Gag/EnvFm-S2, junto a bandas de menor tamaño (probablemente relacionadas a los 7 días de inducción (**Figura 25 A**)). Se puede observar también bandas de degradación a medida que pasan los días de inducción y la desaparición de la banda de ~ 70 kDa al día 10 post inducción.

La proteína Gag fue detectada utilizando el anticuerpo monoclonal anti-p24 (BLV-3) en ambos sobrenadantes (**Figura 24 B y Figura 25 B**). Para la expresión de Gag no se incluyó el péptido de secreción BiP, por lo que su presencia en el sobrenadante podría ser asociada con su incorporación en VLPs.

Teniendo en cuenta el tiempo de aparición de la proteína Gag y el proceso de degradación de Env en ambas líneas generadas, se decidió cosechar el cultivo a los 7 días post inducción.

La expresión de Gag, Envwt y EnvFm en las células transfectadas e inducidas durante 7 días fue evaluada por inmunofluorescencia usando los anticuerpos monoclonales BLV1 que reconoce el epítipo conformacional G en Env (gp51) y el BLV-3 que reconoce la proteína de cápside p24 (**Figura 24 C y Figura 25 C**). En ambos casos, las proteínas Gag y Env fueron detectadas exclusivamente en células transfectadas, no detectando expresión

en las células sin transfectar. Este resultado demuestra que ambas proteínas se expresan en células S2 transfectadas, a pesar de la mutación en el sitio furina para el caso de EnvFm. Este mutante podría representar un adecuado candidato para estabilizar la proteína Env en un estado similar al pre-fusión en la VLP el cual podría usarse como inmunógeno. Para comprender mejor esta alternativa, caracterizamos aún más VLP2.

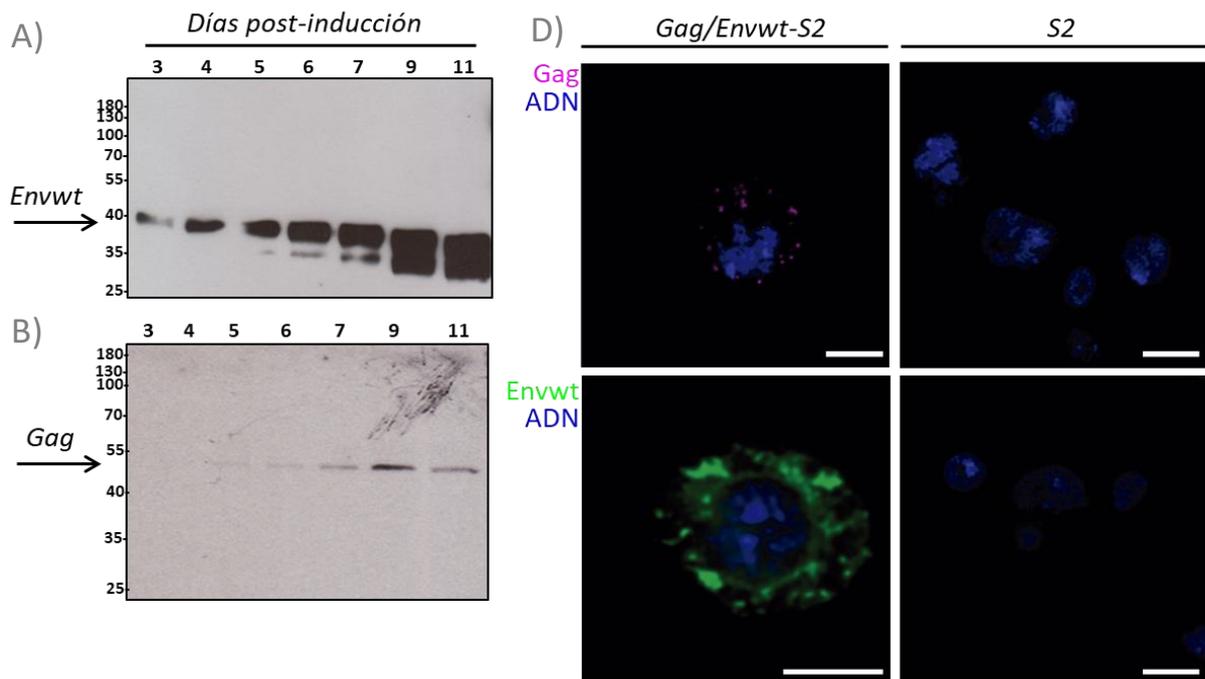


Figura 24. Expresión de las proteínas Envwt y Gag en la línea estable Gag/Envwt-S2.

Células S2 de *Drosophila* fueron co-transfectadas con los plásmidos pMT/Gag y pMT/BiP/Envwt para generar la línea estable Gag/Envwt-S2 para producir las VLB VLP1. La expresión de Gag y Envwt fue analizada por western blot en condiciones de reducción, en el sobrenadante de cultivo inducido durante 11 días. **(A)** La proteína Envwt correctamente procesada por furina, fue detectada con un tamaño entre 35-55 kDa, utilizando el anticuerpo anti-gp51 (BLV2) que reconoce el epítopo líneal D. **(B)** La proteína Gag con un tamaño esperado de 42,8 kDa fue detectada con el anticuerpo monoclonal anti-p24 (BLV3). El tamaño de las proteínas fue detectado con el marcador de PM Page Ruler, de 10 a 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). **(C)** Microscopia confocal de la expresión citoplasmática de Envwt y Gag. Se puede apreciar señal correspondiente a la expresión de ambas proteínas en el citoplasma de las células inducidas con CdCl₂ (Magenta Gag y Verde Envwt), mientras que no se observa señal en las células S2 sin transfectar. Las proteínas fueron detectadas usando los anticuerpos monoclonales anti-gp51 (BLV1) y el anti-p24. El revelado de ambos anticuerpos se realizó utilizando el anticuerpo de cabra anti-IgG murina Alexa 594 (Invitrogen). El ADN fue teñido con verde de metilo (azul). Escala de barra: 5 μm

7.1.2 INCORPORACIÓN DE GAG Y ENV EN VLPS

Una vez confirmada la expresión de ambas proteínas por parte de las líneas celulares, se pasó a producir a mayor escala. El tiempo promedio desde que se descongela un criotubo del banco de trabajo hasta que se cosecha cultivo fue de aproximadamente 21 días (**AnexoII.Figura S 2**). Una vez descongelado, el cultivo se expandió en botellas T25 y T150 hasta llegar a un volumen de 35 mL para luego pasar al crecimiento del cultivo con agitación. En el matraz, el cultivo se expandió hasta obtener una densidad de entre $7-8 \times 10^6$ cel/mL, densidad a la cual se indujo la expresión de las proteínas con CdCl_2 5 μM . El cultivo se expandió mediante el agregado de medio y se lo cultivó durante 7 días. Durante todo el proceso cada vez que se adicionó medio se realizó recuento celular (**AnexoII.Figura S 2**). Las VLPs se produjeron y purificaron de acuerdo con el esquema presentado en **Figura 26.A**. Brevemente, el cultivo inducido durante 7 días se cosechó y clarificó mediante centrifugación durante 5 min a 250xg. El sobrenadante se filtró por 0,45 μm y se ultracentrifugó en colchón de sacarosa al 20%. Las VLP1 conteniendo la Env wt y las VLP2 conteniendo la proteína EnvFm en el estado pre-fusión fueron purificadas y analizadas por wb utilizando los anticuerpos monoclonales anti-p24 y anti-gp51.

Para el caso de las VLP1 (Figura 26 B, izquierda), Gag fue detectada como una única banda con un tamaño de acuerdo con el peso molecular esperado 42,8 kDa, mientras que Envwt fue evidenciada como una banda de aproximadamente 40 kDa correspondiente a la subunidad gp51 correctamente procesada, como se describió previamente para el resultado del western blot de sobrenadante de cultivo.

Para el caso de VLP2 en condiciones de no reducción (NR) la proteína EnvFm fue detectada como una banda de tamaño mayor a 180 kDa, tamaño compatible con el trímero de Env (~ 200 kDa) o multímeros de mayor tamaño, probablemente estabilizados por puentes disulfuro (**Figura 26 B, derecha**). Para evaluar esto, las VLP2 fueron analizadas por western blot en condiciones de reducción (R), revelando la presencia de una banda de aproximadamente 70 kDa correspondiente a EnvFm junto a otras bandas de menor tamaño 35-40 kDa, las cuales no se detectaron en condiciones de NR. Este resultado indica que parte de la proteína EnvFm se encuentra como el precursor gp72 en su largo total (masa teórica 64,5 kDa), junto a especies de menor tamaño las cuales se mantiene unidas mediante puentes disulfuro. La presencia de Gag en las VLP2 fue evidenciada por western blot en condiciones reductoras, mostrando el mismo resultado obtenido para las VLP1 (**Figura 26 B, derecha**).

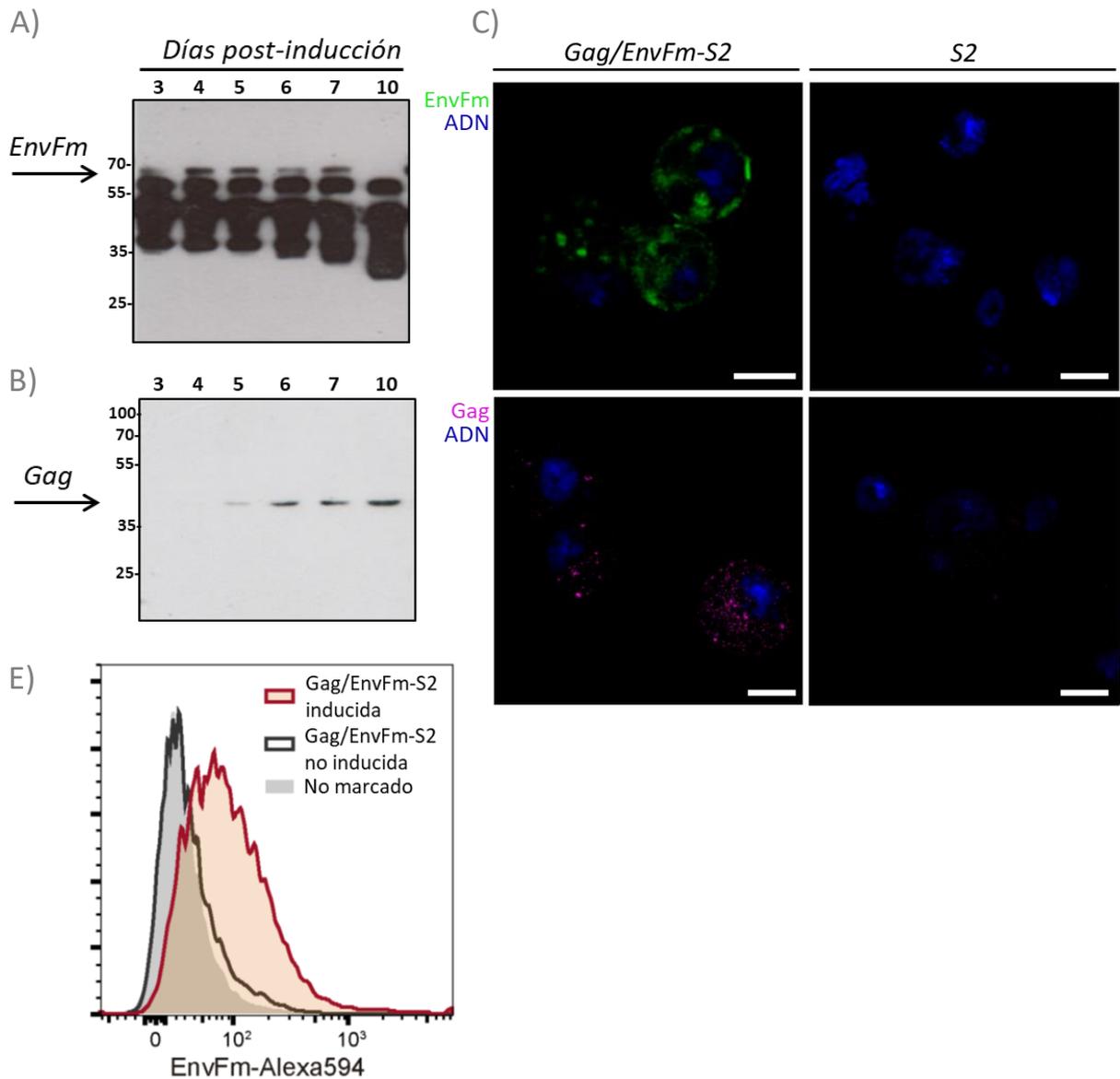


Figura 25. Expresión de las proteínas EnvFm y Gag en la línea estable Gag/EnvFm-S2.

Células S2 de *Drosophila* fueron co-transfectadas con los plásmidos pMT/Gag y pMT/BiP/EnvFm para generar la línea estable Gag/EnvFm-S2 para producir las VLB VLP2. La expresión de Gag y EnvFm fue analizada por western blot en condiciones de reducción, en el sobrenadante de cultivo inducido durante 10 días. **(A)** La proteína EnvFm en su largo total con un tamaño aprox. 65 kDa, y productos de proteólisis fueron detectadas utilizando el anticuerpo anti-gp51 (BLV-2) que reconoce el epítipo lineal D. **(B)** La proteína Gag con un tamaño esperado de 42,8 kDa fue detectada con el anticuerpo monoclonal anti-p24 (BLV3). El tamaño de las proteínas fue detectado con el marcador de PM Page Ruler, de 10 a 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). **(C)** Microscopía confocal de la expresión citoplasmática de EnvFm y Gag. Se puede apreciar señal correspondiente a la expresión de ambas proteínas en el citoplasma de las células inducidas con CdCl₂ (Magenta Gag y Verde EnvFm), mientras que no se observa señal en las células S2 sin transfectar. Las proteínas fueron detectadas usando los anticuerpos monoclonales anti-gp51 (BLV-1) y el anti-p24. El revelado de ambos anticuerpos se realizó utilizando el anticuerpo de cabra anti-IgG murina Alexa 594 (Invitrogen). El ADN fue teñido con verde de metilo (azul). Escala de barra: 5 μm. **(E)** La expresión de EnvFm en la superficie de las células Gag/EnvFm-S2 inducidas con CdCl₂ se analizó mediante citometría de flujo. El histograma gris se representa el control de células no marcadas. Se muestra el incremento de la expresión de EnvFm en la superficie de las células inducidas (histograma rojo), respecto a las no inducidas (línea negra). EnvFm fue detectadas usando el anticuerpo monoclonal anti-gp51 (BLV-1) y revelado con el anticuerpo de cabra anti-IgG murina Alexa 594 (Invitrogen).

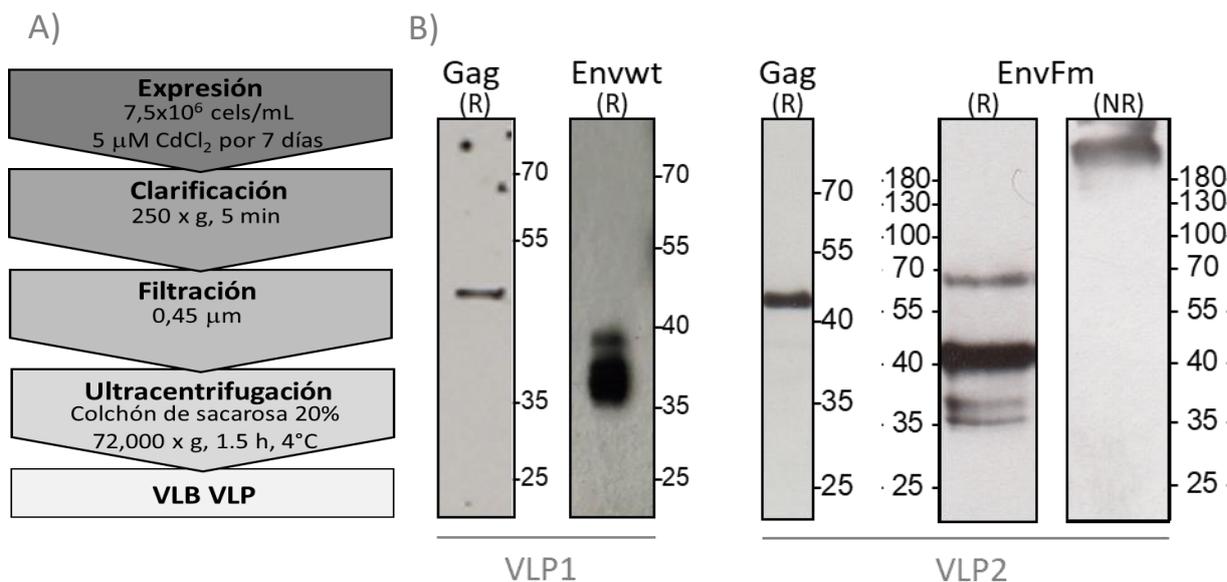


Figura 26. Purificación de VLPs.

(A) Representación esquemática de la estrategia experimental usada para la producir y purificar las VLPs. (B) Análisis mediante western blot de la incorporación de Gag y Envwt o EnvFm en las VLPs. Sobrenadante de cultivo inducido durante 7 días, fue cosechado y ultracentrifugado en colchón de sacarosa. A la izquierda, Wb de las VLP1 en condiciones de reducción (R). A la derecha, wb para las VLP2 en donde EnvFm fue analizada en condiciones de R y no reducción (NR). Las proteínas Gag y Envwt o EnvFm, fueron detectadas usando los anticuerpos monoclonales anti-p24 (BLV3) y anti-gp51 (BLV2), respectivamente. El tamaño de las proteínas fue indicado con el marcador de peso molecular Page Ruler 10 a 180 kDa (Invitrogen).

7.1.3 IDENTIFICACIÓN DE GAG Y ENVFM POR ESPECTROMETRÍA DE MASA

El análisis por LC-MS / MS nos permitió confirmar la presencia de las proteínas EnvFm y Gag en el pellet conteniendo VLP-2. La cobertura de secuencia obtenida para cada proteína a partir de tres réplicas independientes se muestra en la **Figura 27** y **AnexoII. Tabla S 1**.

En el caso de Gag, la cobertura de secuencia total obtenida fue del 17,5%, incluido el motivo PPPY ubicado en el dominio MA (**Figura 27**). La producción de VLP depende del motivo PPPY (identificado) presente en el dominio MA [20] , y de la miristoilación en la glicina amino-terminal la cual está implicada en el ensamblado de Gag y brotamiento de la partícula [63].

En el caso de EnvFm, los péptidos identificados (25% de la secuencia total) permitieron la confirmación de epítopes tanto lineales como conformacionales. Los epítopes conformacionales H y F se identificaron con una cobertura del 100%, mientras que para el epítope G se detectaron 4 de 5 aminoácidos. También se identificó con un 100% de cobertura la secuencia del epítope lineal E y el motivo CX6CC conservado. Para otras secuencias, tales como dominio de neutralización, epítope de células T CD4 + y CD8 +, región heptada 4-3 y péptido de inmunosupresión, se obtuvo una cobertura de secuencia parcial.

Dada la importancia de la glicosilación, buscamos motivos de N-glicosilación en EnvFm presente en las VLP2 producidas en células S2. Se identificó un único péptido glicosilado en EnvFm, SWALLLNQTAR, con una masa experimental de 2311,08 Da y se identificaron dos N-glicanos en el residuo N₂₀₃, Man3GlcNAc2Fuc (m / z = 1038,38 Da) y Man3GlcNAc2 (m / z = 892,32 Da) (Figura 28). Los datos fueron depositados y de libre acceso en la base de datos ProteomeXchange,PRIDE cuyo link de acceso es: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD027973>

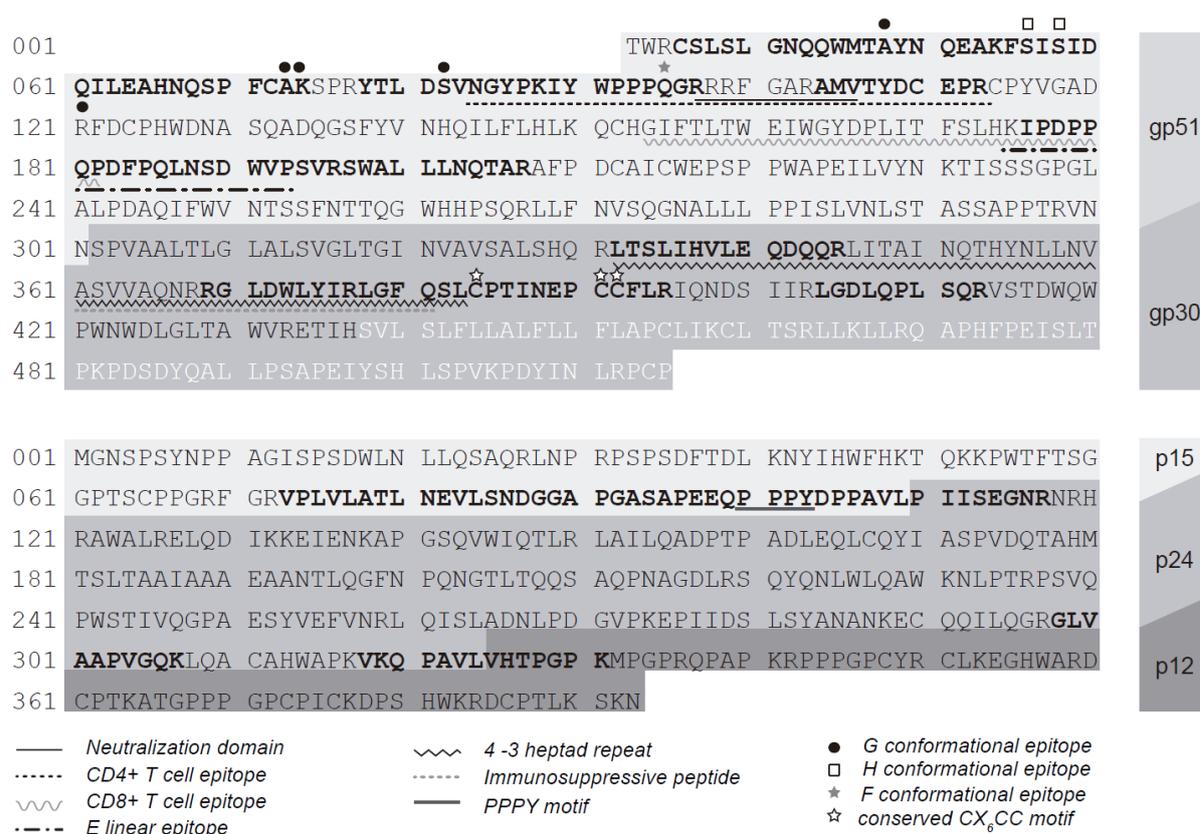


Figura 27. Identificación de la secuencia aminoacídica de EnvFm y Gag expresadas en VLP2 mediante espectrometría de masa.

Arriba se representa la secuencia de la proteína EnvFm y abajo la proteína Gag. Los péptidos identificados para cada proteína se marcan en negrita, y son el resultado obtenido a partir de tres réplicas independientes. La secuencia de las diferentes proteínas en la construcción está sombreada con diferentes grises. Los epítopes conformacionales G, H y F, y el motivo CX₆CC están marcados encima del texto. Los motivos restantes se indican debajo del texto [176].

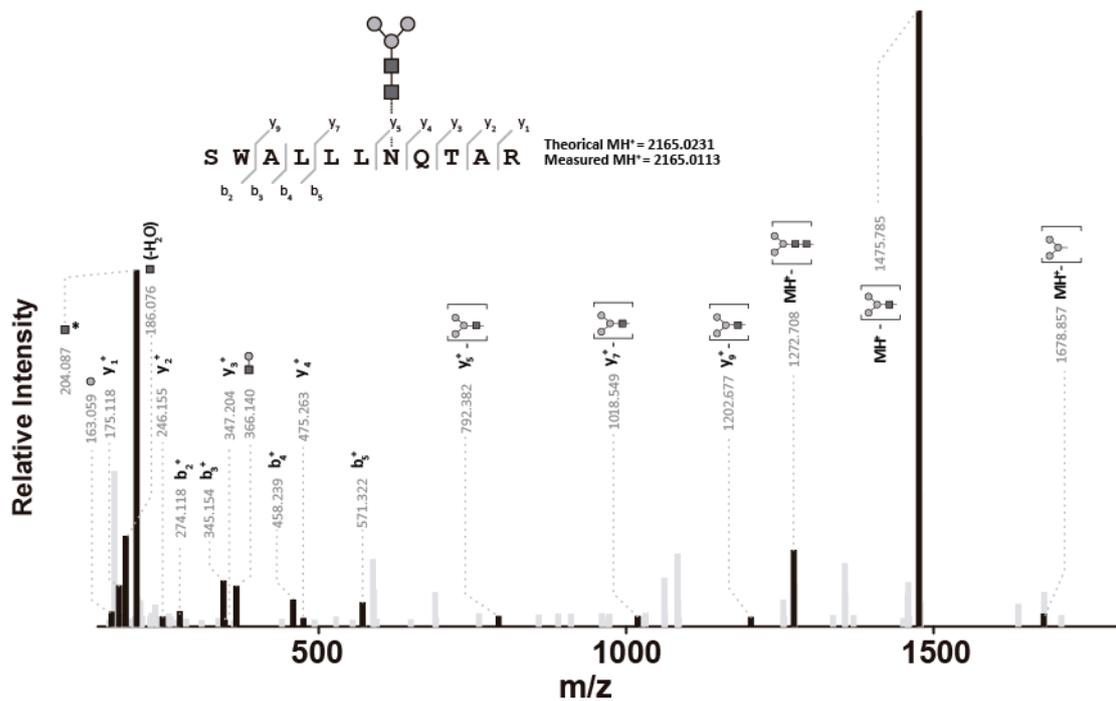
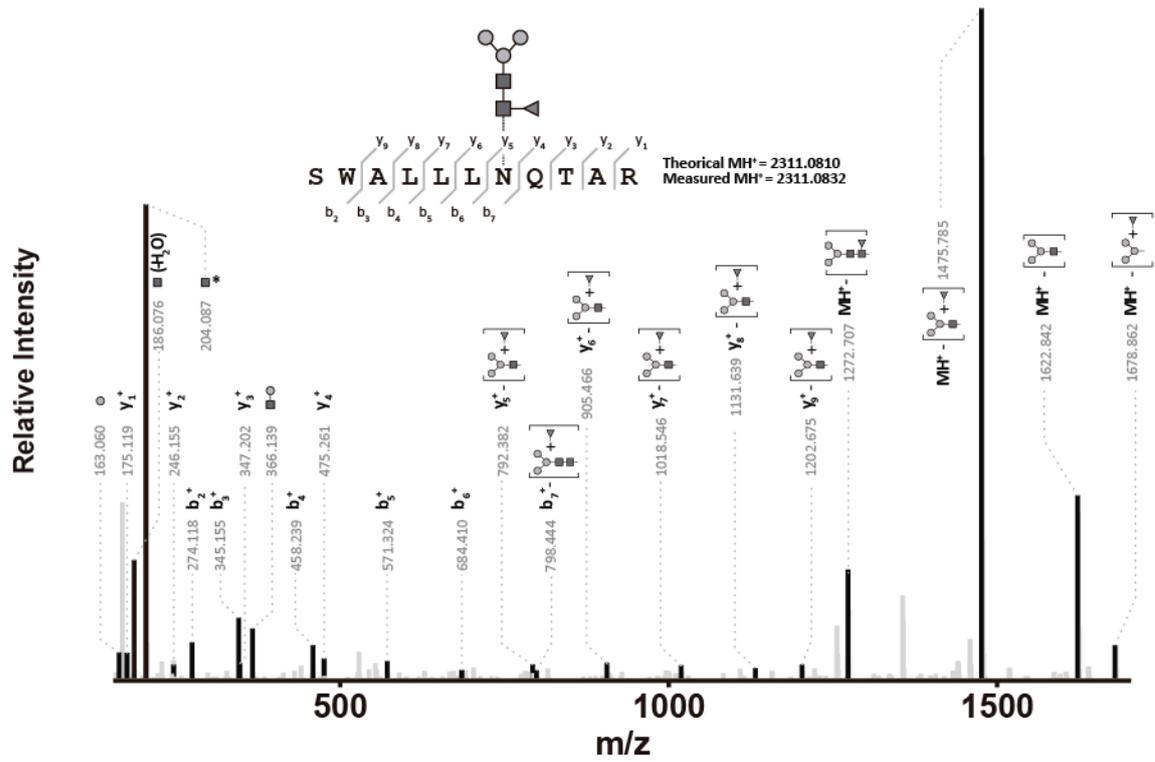


Figura 28. Espectro de MS / MS del péptido N-glicosilado.

Espectro representativo del péptido N-glicosilado en EnvFm con secuencia SWALLLNQ TAR. Arriba se representa la modificación Man3GlcNAc2Fuc, y abajo Man3GlcNAc2. Los iones del fragmento N-terminal y C-terminal, incluidos aquellos con pérdida parcial de la estructura del glicano, están marcados. Man: ● GlcNAc: ■ Fuc: ►

7.1.4 MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE LAS VLPs

El sobrenadante de las células Gag/Envwt-S2 y Gag/EnvFm-S2 inducidas conteniendo las VLP1 y VLP2 fue ultracentrifugado en colchón de sacarosa y el pellet obtenido se re suspendió en PBS. Las VLPs fueron analizadas por MET (para visualizar su morfología) y por dispersión dinámica de la luz (Dynamic Light Scattering-DLS) (para determinar el perfil de distribución de tamaño de las partículas). Por otra parte, el pellet de células S2 inducidas se fijó y fue sometido a cortes ultrafinos para luego ser analizados por MET para visualizar el brotamiento de las VLPs.

Mediante MET de cortes ultrafinos, se pudieron observar estructuras brotando de ambas líneas celulares, con forma y tamaño esperado para las VLPs (Figura 29 A, Anexoll.Figura S 4, Anexoll.Figura S 6, Anexoll.Figura S 5, Anexoll.Figura S 7).

En la MET con tinción negativa de partículas purificadas, se pudo observar en ambos casos (VLP1 y VLP2) una abundancia de partículas aproximadamente esféricas no agregadas y de tamaño variable (70-200 nm) (Figura 29 B, Anexoll.Figura S 5, Anexoll.Figura S 7). Dentro de esta población polidispersa ambos tipos de VLPs se observaron como partículas rodeadas de una membrana lipídica (de aspecto brillante) con un core electrondenso. Este aspecto electrondenso es el resultado de la interacción del acetato de uranilo utilizado en la tinción negativa con los grupos fosfato y amino, tiñendo proteínas, ácidos nucleicos y membranas lipídicas [177]. Este resultado es consistente con lo reportado previamente en varios trabajos en los cuales producen VLPs de retrovirus empleando diferentes sistemas de expresión [178–185]. Sin embargo nuestros resultados difieren de lo observado por otros autores [161], [63], [162], los cuales previamente han expresado VLPs de VLB basadas únicamente en la proteína Gag. En estos trabajos describen a las VLPs con un anillo electrondenso debajo de la membrana viral y con un núcleo “vacío”, esto debido a la ausencia de proteasa viral, similar a las partículas retrovirales inmaduras. Sin embargo, como se mencionó más arriba en el texto, el acetato de uranilo empleado en la tinción negativa, tiene afinidad por las proteínas, así como también por los ácidos nucleicos. Las VLPs al brotar de la célula además de incorporar en su interior proteínas celulares, en ausencia del genoma viral, es capaz de incorporar altos niveles de ARN celular. Esta encapsidación de ARN no específica está mediada por la unión de ARN a residuos básicos distribuidos a lo largo de varios dominios de Gag. Está demostrado que mutaciones específicas en estos dominios presentes en Gag, impiden el empaquetamiento de ARN y, en consecuencia, es incapaz de ensamblarse en partículas. Por lo tanto, se ha demostrado que el ARN desempeña un papel estructural clave en el ensamblaje de partículas de virus al servir como un andamio sobre el cual se pueden ensamblar múltiples moléculas de Gag [162].

Para el análisis por DLS, las medidas para cada muestra se realizaron a 25°C y por triplicado. Esta técnica permitió analizar la distribución de tamaños de partícula (radio hidrodinámico, R_H en nm) de acuerdo con la intensidad de la luz dispersada Figura 29.

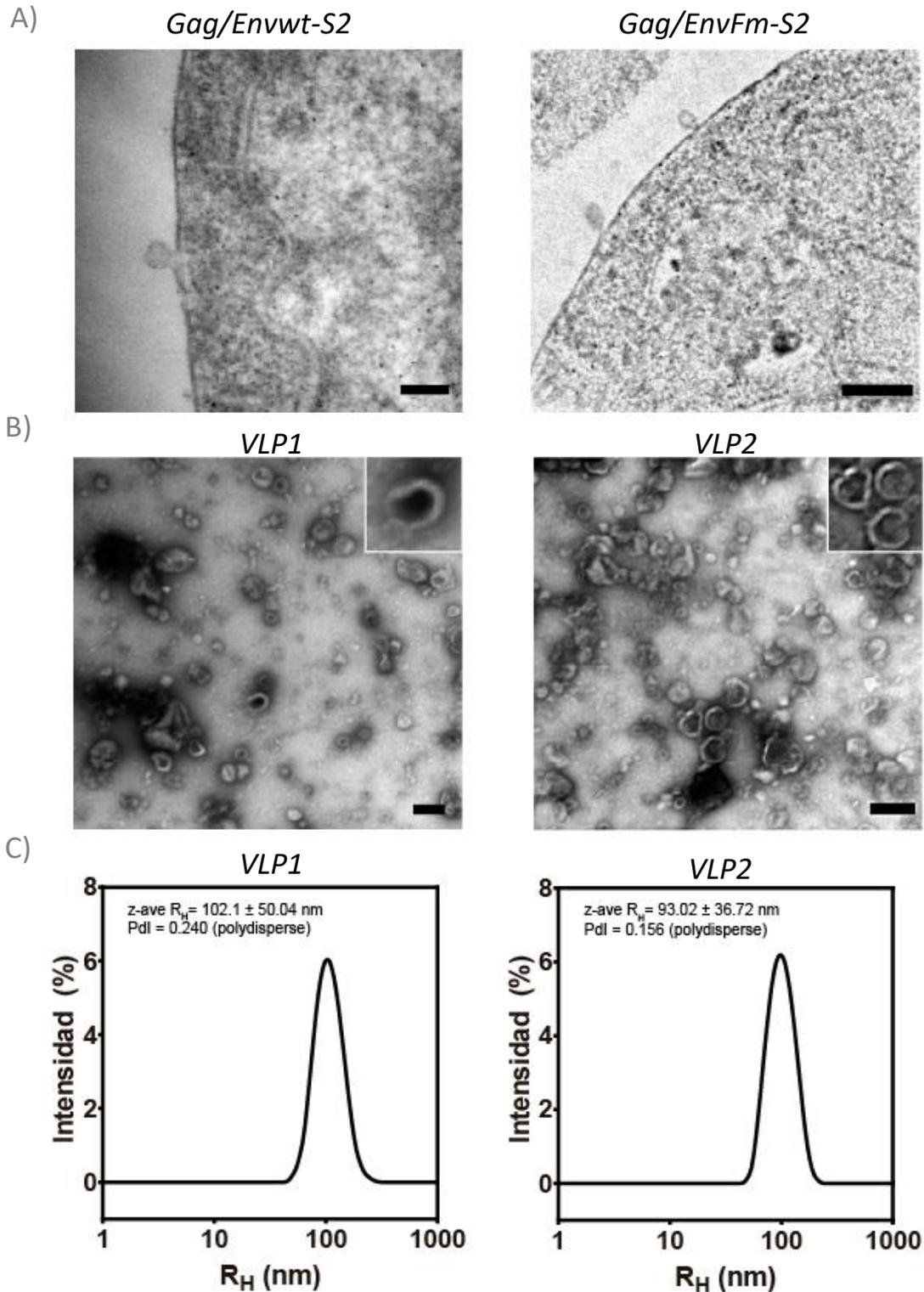


Figura 29. Morfología y tamaño de las VLPs.

(A) Imágenes de MET de cortes ultrafinos, donde se puede apreciar estructuras brotando de ambas líneas celulares. Barra 100 nm. (B) Imágenes de MET con tinción negativa de VLP1 y VLP2 purificadas. Se observan numerosas partículas no agregadas de morfología aproximadamente esférica y tamaño variable (70-200 nm). Barra 100 nm. (C) Análisis por DLS de la distribución de tamaños de las VLPs. Se observó una distribución de tamaños monomodal con un único pico de intensidad, con una población polidispersa. El tamaño de distribución se muestra como el promedio de tres medidas y la media de tamaño es representada como z-avergae R_H (z-ave R_H) (en nm con desviación estándar) y el valor del índice de polidispersión.

Se obtuvo una distribución de intensidad monomodal con un único pico, con una población polidispersa caracterizada por un radio hidrodinámico z-average (z-ave RH±sd) de 102.1±50.04 nm para VLP1 y 93.02±36.72 nm para VLP2 con un valor de índice de polidispersión (Pdl) de 0.156 y 0.240, respectivamente. Los resultados obtenidos por DLS son concordantes con los obtenidos por MET. La población polidispersa observada, podría deberse a la metodología de purificación (colchón de sacarosa), ya que podrían co-purificarse con las VLPs, vesículas recubiertas de membrana con una densidad similar a la de las VLP (exosomas, microvesículas) [94]. Sin embargo, para confirmar que lo que vemos en la MET son VLPs de VLB conteniendo Env y Gag, deberíamos de hacer una MET con inmunomarcado conjugado con oro con un anticuerpo anti-p24 y o anti-gp51, así como también para diferenciarlas de exosomas usar algún tipo de marcador diferencial.

7.1.5 PROPIEDADES ANTIGÉNICAS DE LAS VLPs

Previamente determinamos que las VLP1 y VLP2 purificadas resultaron ser antigénicas cuando usamos los anticuerpos monoclonales, VLB-1, el cual reconoce el epítoto conformacional G (presente en gp51), VLB-2, que reconoce el epítoto lineal DD' (presente en gp51) y el VLB-3 el cual reconoce la proteína de cápside, p24.

Para ir más al detalle en la caracterización antigénica de las proteínas Envwt, EnvFm y Gag las enfrentamos a sueros murinos disponibles en nuestro laboratorio. Estos sueros fueron generados contra las proteínas ectoEnvFm (producida en células S2 de *Drosophila*) y de cápside, p24 (producida en *E.coli*) y se denominan: ENV-3 y CA-3, respectivamente.

Las proteínas EnvFm, Envwt y Gag presentes en el sobrenadante de la línea celular Gag/Envwt-S2 o Gag/EnvFm-S2, resultaron ser antigénicas frente a los sueros murinos ENV-3 y CA-3 (**Figura 30. A**). Para el caso del suero CA-3 se puede ver que la presencia de una banda de tamaño aproximado a 42 kDa correspondiente a Gag. Cuando usamos el suero murino ENV-3, podemos ver que es capaz de reconocer la proteína Envwt, pudiendo observar una banda correspondiente a gp51 (banda de tamaño mayor a 55 kDa) y a gp30 (banda de aproximadamente 35 kDa). Respecto a la proteína EnvFm, vemos el mismo perfil de bandas que cuando empleamos el anticuerpo monoclonal BLV-2.

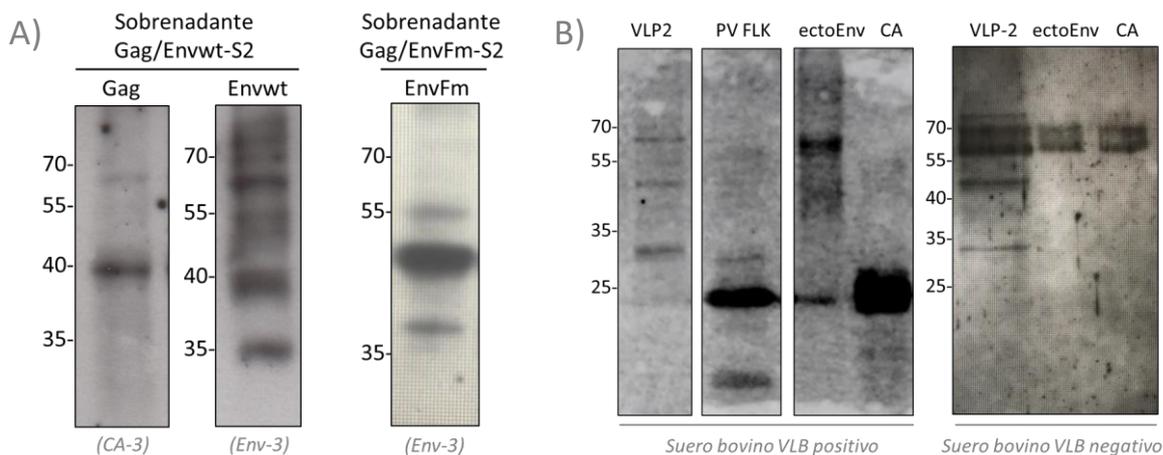


Figura 30. Antigenicidad de las VLPs evaluada por western blot.

(A) Las proteínas Gag, Envwt y EnvFm se detectaron en el sobrenadante de las líneas estables inducidas. Se utilizaron los sueros murinos ENV-3 y CA-3. Para el caso de las VLP-1 se identifica una banda inmunoreactiva con un peso molecular que se corresponde con Gag y gp51. Para VLP-2, también con ENV-3 se observa gp51. **(B)** Las VLP-2 purificadas se enfrentaron a sueros bovinos VLB positivos y negativos. Se incluyeron como controles: partículas virales purificadas a partir de la línea celular FLK (PV FLK) y las proteínas recombinantes ectoEnv y p24.

Por otra parte, evaluamos la antigenicidad de las VLP2 purificadas frente a sueros bovinos positivos y negativos para VLB (sueros previamente analizados por ELISA). Se obtuvieron las mismas bandas inmunoreactivas usando el suero negativo y positivo (**Figura 30. B**). El suero positivo fue capaz de reconocer a las proteínas recombinantes purificadas utilizadas como control (ectoEnvFm y la proteína de cápside p24).

Asimismo, cuando enfrentamos este suero a partículas virales de VLB purificadas a partir de células FLK, la banda más inmunoreactiva fue la correspondiente a cápside (p24), seguido por la proteína nucleocápside (p12). Sin embargo, este suero tampoco fue capaz de reconocer a la proteína Env en las partículas virales de VLB. Esto puede ser el resultado de la relación de proteína Gag:Env en la partícula viral (1500 Gag :10 trómeros Env). Yang *et al.*, analizaron la glicosilación de la proteína Env de HIV expresada de manera soluble y en VLP (ambas expresadas en células S2 de *Drosophila*), mediante el tratamiento con Endo H y vieron una reducción de 46 kDa y 35 kDa en Env Soluble y Env de VLP, respectivamente. Este resultado, no solo les permitió concluir que ambas proteínas producidas en S2 estaban N-glicosiladas, sino también que presentaban diferentes perfiles de glicosilación a pesar de expresarse en el mismo tipo celular [166]. La **Tabla 3** se resumen los resultados obtenidos con los diferentes anticuerpos monoclonales y sueros (murinos o bovino) utilizados frente a las VLP1 y VLP2.

Tabla 3

Resumen de las propiedades antigénicas de las VLPs.

	VLP1		VLP2		EnvFm expresión en membrana
	Sobrenadante	Purificadas	Sobrenadante	Purificadas	
BLV-1 (anti-gp51)	NR	NR	NR	NR	+
BLV-2 (anti-gp51)	+	+	+	+	NR
BLV-3 (anti-p24)	+	+	+	+	NR
ENV-3 (policlonal de ratón)	+	-	+	NR	NR
CA-3 (policlonal de ratón)	+	+	NR	NR	NR
Suero bovino (+)	NR	NR	NR	-	NR
Suero bovino (-)	NR	NR	NR	-	NR

NR: no realizado, +: resultado positivo, -: resultado negativo

La glicoproteína Env trimérica se presenta en la superficie de las partículas retrovirales en una conformación metaestable. Luego de ser procesada por proteasas celulares de tipo la furina, las subunidades SU y TM se mantienen unidas mediante un enlace disulfuro intersubunidad. A pesar de que este mecanismo no se comprende completamente, la isomerización del enlace disulfuro conduce al establecimiento de enlaces disulfuro intrasubunidad y la disociación de las subunidades SU y TM genera un dramático cambio conformacional que tiene como resultado la fusión entre las membranas viral y celular.

Este cambio conformacional conduce a la exposición de regiones no neutralizantes presentes en la proteína Env al sistema inmune, dando lugar a un mecanismo de evasión inmune conocido para varios retrovirus como HTLV [186] y VIH [187]. Además, se encontró que la gp120 del VIH (análoga a la subunidad gp51 de VLB) era muy flexible [188], lo que resulta en una presentación del sistema inmunológico que puede involucrar diferentes conformaciones estructurales, desviando así la atención a ENV. Esta diversidad conformacional también impone barreras significativas en el desarrollo de vacunas eficientes destinadas a inducir anticuerpos neutralizantes, en este sentido se han propuesto varias estrategias para estabilizar los trímeros de Env en el estado de pre-fusión [189], [190], [191], [192]. Recientemente, en un trabajo realizado por Gonelli et al., generaron VLPs que presentaban trímeros de Env de VIH estabilizados mediante la introducción de disulfuros entre subunidades y una mutación de sustitución de prolina (SOSIP). Las VLPs modificadas resultantes fueron capaces de activar eficazmente las células B al presentar epítopes reconocidos por anticuerpos neutralizantes y, al mismo tiempo, minimizar la exposición de sitios no neutralizantes reconocidos por anticuerpos [193].

Nuestro grupo ha expresado previamente el ectodominio de la proteína Env de VLB (ectoEnvwt) de manera soluble en células S2 de *Drosophila*, dando lugar a complejos gp51-gp30 inestables, que mostraron una alta tendencia a formar agregados; mientras que el mutante en el sitio de procesamiento proteolítico (ectoEnvFm) mostró una mayor estabilidad [168].

Trabajos previos enfocados en la producción de VLPs de VIH en células de insectos, mostraron una correcta maduración de la proteína Env por parte de proteasas tipo furina endógenas presentes en las células S2 de *Drosophila* [166], [179], [194], por lo que decidimos mutar el sitio de procesamiento proteolítico de Env de VLB, con el fin de conservar los epítotope presentes en gp51 y gp30 unidos en la superficie de VLP y, al mismo tiempo, inmovilizar a la proteína en una conformación pre-fusión más estable, reduciendo así la evasión inmune. Otras modificaciones en la secuencia podrían considerarse, pero la falta de datos estructurales tridimensionales del trímero de Env de VLB no nos permite avanzar hacia un diseño racional. El programa de inteligencia artificial Alpha Fold recientemente publicado, que realiza predicciones de estructuras de proteínas en 3D a partir de sus secuencias de aminoácidos, puede ser una alternativa potencialmente útil para resolver este problema [195].

En esta tesis, se transfectaron células S2 de *Drosophila melanogaster* con vectores de expresión que codifican las proteínas Gag y Env de VLB para generar líneas celulares estables capaces de producir dos tipos de VLPs. La expresión de las proteínas Gag, Envwt y EnvFm en ambas líneas celulares estables se confirmó mediante western blot e inmunofluorescencia y su antigenicidad se evidenció utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen epítotope lineales y conformacionales. Además, la incorporación de la proteína EnvFm en la membrana de las células transfectadas se confirmó mediante citometría de flujo. En conjunto, estos resultados muestran que la mutación en el sitio de procesamiento proteolítico presente en Env no afecta drásticamente ni su expresión ni su entrada en la vía secretora de las células de insectos S2. Además, su detección por el anticuerpo monoclonal BLV1 (que reconoce el epítotope conformacional G) sugiere que EnvFm retiene motivos estructurales importantes cuando se expresa en células de insecto S2.

La presencia de Gag, Envwt y EnvFm en las VLPs purificadas se demostró mediante western blot. Para el caso de las VLP1, solo se detectó una banda con el peso molecular correspondiente a gp51, lo cual indica que Envwt está completamente procesada por proteasas de tipo furina celulares como era de esperar. Para el caso de la proteína EnvFm presente en las VLP2, la misma se produce como el precursor gp72 de largo completo además de sufrir escisiones parciales, que permanecen unidos covalentemente por enlaces disulfuro. La génesis de esta proteólisis parcial no ha sido elucidada por nosotros, sin embargo, el reconocimiento de otras secuencias de manera menos eficiente por diferentes proteasas tipo furina

presentes en *Drosophila*, podría ser una explicación plausible para esto [196]. Por otro lado, no podemos excluir la posibilidad de que una proporción de la proteína EnvFm sea escindida por otro tipo de proteasas celulares. De hecho, las proteasas celulares desempeñan un papel crucial al regular la conformación de las principales proteínas virales [197], [198]. Así mismo, no podemos descartar también, la existencia de sitios de hidrólisis no descritos para otras proteasas celulares [199].

La identidad de las proteínas EnvFm y Gag presentes en las VLP2 purificadas se confirmó mediante espectrometría de masas. En el caso de la proteína EnvFm se detectaron varios péptidos, lo que permitió la identificación de motivos distintivos, algunos de ellos conteniendo epítopes conformacionales y lineales de gp51 de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo.

Con respecto a la glicosilación de la proteína EnvFm identificamos dos residuos paucimanosídicos en la asparagina 203, de acuerdo con los resultados anteriores obtenidos con el ectodominio soluble recombinante de BLV-Env expresado en células S2 *Drosophila* en nuestro laboratorio [188] y de acuerdo con el tipo de glicosilación descrito en células de insectos [200],[201]. La presencia de un sitio de N-glicosilación en esta posición, que se ha demostrado que es esencial para la infección in vitro de BLV [170], sigue siendo una característica importante en nuestro intento de producir partículas no infecciosas que muestren epítopes que imitan a los encontrados en viriones nativos. La N-glicosilación de la proteína Env es esencial para la infectividad del BLV y podría formar parte de ciertos determinantes antigénicos de VLB [170], [47]. En este sentido, teniendo en cuenta la baja cobertura de identificación de secuencia obtenida por MS, junto con los resultados previos obtenidos en nuestro grupo [168], al igual que en los viriones de VLB nativos, la proteína Env presente en las VLPs está altamente glicosilada incluso considerando la presencia de los N-glicanos paucimanosídicos generados por las células S2. Además, la migración electroforética de EnvFm identificada por western blot concuerda con la presencia de varias modificaciones que aumentan la masa total de la proteína. En este sentido, la paucimanosilación del antígeno puede representar un mecanismo prometedor para aumentar la inmunogenicidad de una potencial vacuna [202].

En el caso de Gag, uno de los péptidos identificados en el dominio MA (p15) contiene el motivo PPPY que es esencial en el ensamblaje y gemación de la partícula BLV [63], [20].

Estructuras con forma y tamaño que se asemejan a las VLP se visualizaron en imágenes MET obtenidas de cortes ultrafinos de células S2 transfectadas e inducidas. El análisis por MET de las VLP purificadas mostró la presencia de vesículas esféricas no agregadas con tamaño variable y los resultados de DLS confirmaron la naturaleza polidispersa y no agregada de esta fracción. Esta polidispersión podría estar asociada a la existencia de VLP de tamaño variable, sin embargo no podemos descartar la coexistencia de vesículas

recubiertas de membrana con densidad similar (exosomas, microvesículas) que podrían co purificarse en la fracción VLP [203].

Varios trabajos se han llevado a cabo con el objetivo de desarrollar una vacuna capaz de generar una respuesta protectora frente al VLB; sin embargo, hasta ahora, no existe ninguna vacuna comercial que garantice una protección eficaz y/o una menor transmisión de la infección por VLB. Preparaciones de virus inactivado o lisados de células persistentemente infectadas, confirieron una protección parcial. Proteínas recombinantes como gp51 o p24, o péptidos derivados de las mismas fueron evaluadas en protocolos de inmunización. A pesar de ser inmunogénicas, la respuesta generada no fue protectora frente al desafío con VLB. Vectores virales recombinantes, basados en vaccinia virus expresando gp51, confirieron una protección parcial y hubo una disminución la carga viral en ovinos, pero fallaron cuando se ensayó en bovinos. Y finalmente, vacunas de ADN expresando las proteínas Env y Tax, si bien fueron capaces de generar una fuerte respuesta inmune, no fueron capaces de prevenir la infección. La principal limitación de estas vacunas es la rápida caída del título de anticuerpos en el tiempo y la no estimulación de la respuesta celular [204], [205], [124], [140], [141], [136], [72].

En Argentina el grupo de Karina Trono en INTA-Castelar, está llevado a cabo un estudio con una vacuna atenuada la cual consiste en un provirus que contiene múltiples deleciones y mutaciones en genes relacionados en la patogénesis viral (Tax y G4) [72]. Este provirus demostró tener bajos niveles de replicación, y además ser capaz de estimular eficientemente la respuesta inmune humoral y celular en bovinos [112], [150]. Esta estrategia parece muy promisorio, sin embargo esta vacuna presenta algunas cuestiones controversiales mencionadas por los autores tales como: 1) deriva genética, a partir de la cual podría ocurrir una reversión de las mutaciones hacia la secuencia wt, 2) cambio antigénico, como resultado de la recombinación entre el provirus atenuado y el virus wt, 3) adquisición de mutaciones que incrementen la patogenicidad, tales como se vio en [47], donde la sustitución en el sitio de glicosilación de N230E, da lugar a un virus más patogénico, 4) infección de animales negativos por parte de animales vacunados, de la vaca al ternero a través del calostro, o a través del semen [150].

En esta tesis, generamos dos tipos de VLPs, las VLP1 que presentan la Envwt y las VLP2 que presentan la EnvFm sin procesar. Bai et al., 2015, realizaron un estudio donde usando una biblioteca de 115 péptidos sintéticos que cubren la totalidad de la proteína Env (gp51 y gp30), la proteína Gag (p15, p24 y p12) y la proteína Tax de VLB, identificaron 11 nuevos epítopes de células T CD8+. Dentro de estos 11 epítopes, los presentes en la subunidad gp30 fueron capaces de estimular una alta proliferación de células CD8+, lo cual indica que la respuesta inmune celular está fuertemente dirigida a gp30. Además, vieron que estos epítopes parecen ser menos polimórficos frente a los epítopes CD8+ identificados en gp51, los cuales poseen una alta variabilidad. Discuten además, que la falla en los numerosos trabajos de desarrollo de vacunas contra el VLB,

se debe a que se usaron principalmente estrategias basadas en la proteína gp51 y afirman que gp30 es el mejor candidato para el desarrollo de una vacuna contra el VLB [46]. Sin embargo, la subunidad gp51 también presenta epítopes CD8+ y CD4+, y de neutralización. Por otra parte, gp51 se ha descrito como la proteína más inmunogénica del VLB, ya que es capaz de inducir la expresión de anticuerpos específicos en animales infectados [206], [137]. Por lo tanto, todo apuntaría a que el mejor candidato para una vacuna contra el VLB debería contener la proteína Env completa, la cual contribuiría mejor al desarrollo de una respuesta inmune eficiente.

Teniendo en cuenta las diferentes estrategias probadas para el desarrollo de una vacuna contra la infección por VLB [150], [72], además de las características de presentación de antígenos en forma particulada [154], el riesgo biológico reducido asociado al uso de antígenos no infecciosos, y las características inmunogénicas de proteínas con patrones de N-glicosilación ricos en manosa, las VLP de VLB producidas en células S2 de *Drosophila* constituirían un buen candidato como inmunógeno para ser utilizado en el desarrollo de una vacuna contra el VLB. El mismo, podría contribuir, junto con otras estrategias de control, a reducir la transmisión del virus. Estudios *in vivo* son aún necesarios para evaluar su capacidad de estimular respuestas inmunes eficaces y su posible aplicación en el diseño racional de una vacuna eficaz.

7.2 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS E INMUNOSUPRESORAS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE ECTOENV DE VLB

7.2.1 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ECTOENV Y ECTOENVIM EN CÉLULAS S2 DE *DROSOPHILA*

Esta sección de la tesis involucró la producción en células S2 del ectodominio de la proteína Env de VLB con el dominio de inmunosupresión mutado.

El plásmido de expresión contiene el péptido señal BiP perteneciente a *Drosophila* que sustituye el péptido señal de VLB permitiendo una eficiente translocación de la glicoproteína Env naciente hacia el retículo RE de la célula transfectada y su posterior secreción al medio de cultivo.

Como mencionamos previamente, disponemos del plásmido pT350ectoEnv, a partir del cual se expresa Env con el sitio furina mutado (ectoEnvFm) [168]. A partir de esta construcción, se generó mediante mutagénesis dirigida, el mutante ectoEnvFmIm (**Figura 21**).

Todos los clonajes se realizaron mediante RF-cloning. Una vez generadas las construcciones y confirmadas las secuencias (**Anexo II, 13.1**), los plásmidos se propagaron a gran escala en bacterias DH5 α , de manera tal de obtener una cantidad suficiente de ADN plásmidico para la transfección.

La generación de las líneas estables que producen las diferentes proteínas se realizó mediante la co-transfección de células S2 con los plásmidos pT350ectoEnvFm/pCoPuro (ectoEnvFm), pT350ectoEnvFmlm/pCoPuro (ectoEnvFmlm). El proceso de selección de cada línea se llevó a cabo en medio Schneider's conteniendo SFB y puromicina. Las células fueron propagadas y adaptadas gradualmente al crecimiento sin suero en un medio de cultivo libre de proteínas (Insect Xpress). Al cabo de aproximadamente 4 semanas se obtuvieron las dos líneas estables policlonales, ectoEnvFm-S2 y ectoEnvFmlm-S2. Si bien en nuestro laboratorio ya contábamos con una línea estable para expresar la ectoEnvFm [168], se volvió a generar en paralelo.

La expresión de las proteínas se evaluó mediante ensayo de inducción temporal con CdCl₂ y el sobrenadante del cultivo se analizó por SDS-PAGE/western blot empleando el anticuerpo monoclonal BLV-2 (**Figura 31**). Se puede apreciar que tanto en condiciones de inducción como de no inducción una banda a la altura de 55 kDa la cual se corresponde con la proteína ectoEnvFm o ectoEnvFmlm, cuyo peso molecular teórico estimado es de 49,5 kDa (sin glúcidos). En estas construcciones no se observan diferencias en cuanto a la expresión ya sea en muestras inducidas y sin inducir, y tampoco se observan diferencias en cuanto al nivel de expresión entre las 7 y 96 hs post inducción. A partir de este resultado se eligió como tiempo de inducción 30 hs para evitar productos de degradación.

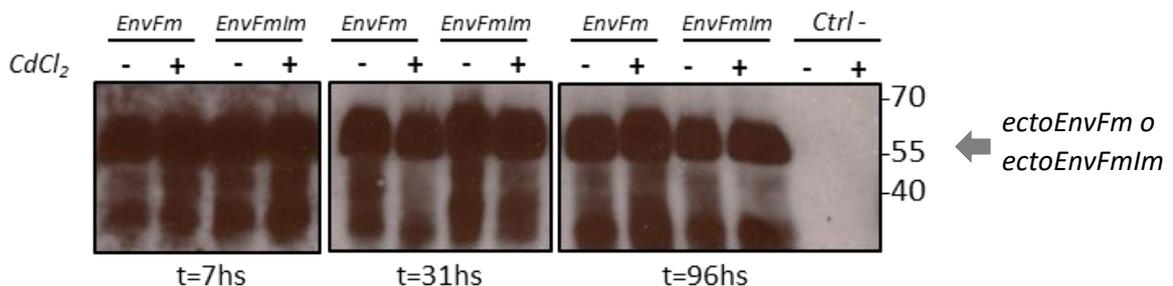


Figura 31. Ensayo de cinética de inducción.

Se evaluó la expresión de las proteínas ectoEnv y ectoEnvlm, mediante SDS-PAGE/Wb a partir de sobrenadante de células transfectadas en presencia (+) o ausencia (-) de CdCl₂. Se observa una banda de 55 kDa y ambas proteínas se expresan en presencia y ausencia de inductor.

7.2.2 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ECTOENV Y ECTOENVIM

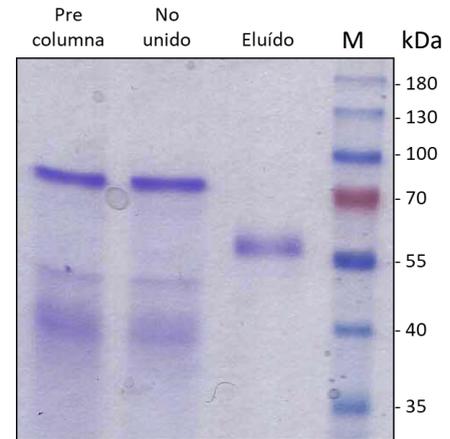
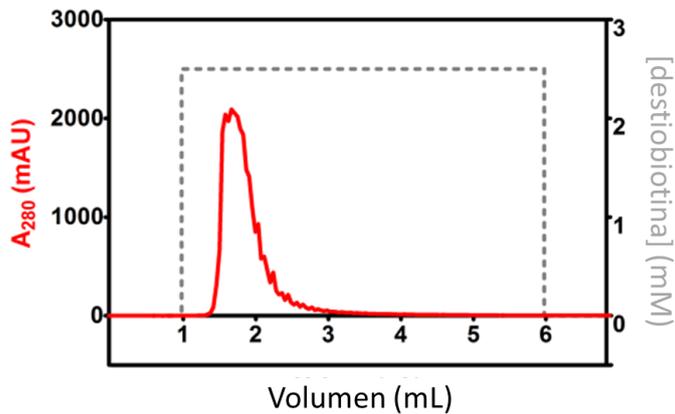
Luego de analizada la expresión de las proteínas, las líneas estables generadas se adaptaron a medio libre de proteínas y los cultivos se crecieron a mayor escala y con agitación. El sobrenadante de cultivo inducido fue cosechado a las 30 hs post-inducción. Como se mencionó en la metodología, las purificaciones se realizaron mediante cromatografía de afinidad. En ambos casos se obtuvo un pico único y definido, con una A280 cercana a 2000 mAU. Como se puede ver en la **Figura 32. A y B**, ambas proteínas se purificaron correctamente, pudiendo observar que ambas permanecen retenidas a la columna hasta el momento de la elución y prácticamente no se observan contaminantes. En promedio el rendimiento obtenido para ambas proteínas fue de 10 mg/ L de cultivo para ectoEnvFm y ectoEnvFmIm, resultado similar al obtenido previamente por Tomé et al.,[168]. Se realizó la identificación de la proteína ectoEnvFmIm mediante espectrometría de masa donde se confirma la identidad de la proteína con un 60% de cobertura total de secuencia **Figura 32. B**.

El estado de oligomerización de la proteína se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC, size exclusion chromatography) utilizando una columna Sx 200 10/300 y 500 μ L de proteína previamente purificada por cromatografía de afinidad.

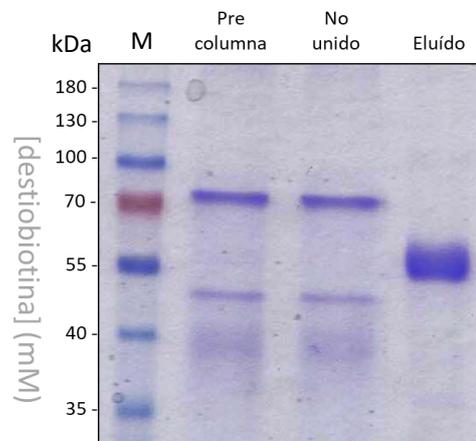
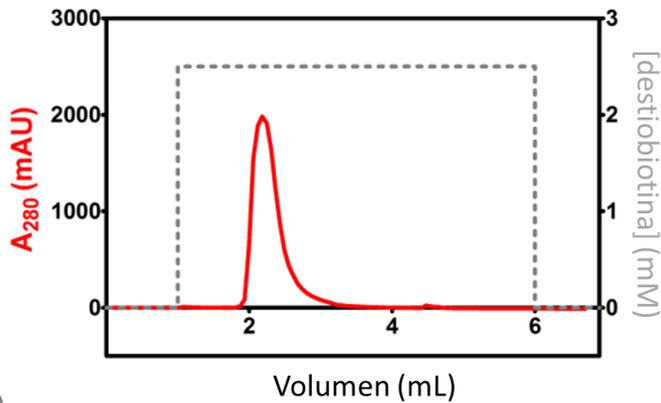
En la **Figura 33. A**, se muestra el perfil de elución para cada una de las proteínas, donde se obtuvieron tres picos los cuales eluyeron a un volumen que se corresponde con especies moleculares de aproximadamente 440, 158 y 75 kDa, correspondiéndose con las especies, oligómeros de tamaño mayor al trímero, trímero y monómero (de acuerdo con el calibrador de la columna). El resultado obtenido en la cromatografía de exclusión molecular de la proteína ectoEnvFm fue el mismo que se obtuvo previamente [168].

Se tomaron fracciones representativas de cada uno de los tres picos y se analizaron por SDS-PAGE/AgNO₃ en condiciones de reducción y no reducción (**Figura 33.B**). En condiciones de no reducción, para la fracción A11, B3 y B8 no se observaron bandas, hecho que concuerda con el estado oligomérico que presenta la proteína (> a trímero), la cual, por una cuestión de tamaño, no podría ser resuelta en el gel. En la fracción C7 correspondiente al dímero también en condiciones de no reducción, se observó una banda de tamaño correspondiente a ectoEnvIm (55 kDa). Si bien no era de esperar la presencia de esta banda, el hecho de que los picos no están completamente definidos es posible que la especie monomérica se encontrara en dicha fracción.

A) *ectoEnv*



B) *ectoEnvIm*



C)

1	MKLCILLAVV AFVGLSLG	RS	TWRCSLSLGN	QQVMTAYNQE	AKFSISIDQI
51	LEAHNQSPFC	AKSPRYTLD	VNGYPKIYWP	PPQGRRRFGA	RAMVTYDCEP
101	RCPYVGADR	DCPHWDNASQ	ADQGSFYVMH	QILFLHLKQC	HGIFTLTWEI
151	WGYDPLITFS	LHKIPDPPQP	DFPQLNSDW	PSVRSWALL	NQTARAFPDC
201	AICWEPSPPW	APEILVYNKT	ISSSGPGLAL	PDAQIFWNT	SSFNTTQGM
251	HPSQRLLFN	SQGNALLPP	ISLVNLSTAS	SAPPTRVNNS	PVAALTLGLA
301	LSVGLTGINV	AVSALSHQRL	TSLIHVLEQD	QQLRITAINQ	THYNLLNVA
351	VVGANARGLD	WLYIRLGFQS	LCPTINEPCC	FLRIQND	SII RLGDLQPLSQ
401	RVSTDWQWPW	NWDLGLTAW	RETIDGPFED	DDDKAGWSHP	QFEKGGGSGG
451	GSGGGSWSHP	QFEK			

EK
ST

ST

Figura 32. Purificación de las proteínas *ectoEnv* y *ectoEnvIm*. Identificación de *ectoEnvIm* por espectrometría de masa.

Ambas proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando columnas StrepTrap HP. Se muestra el pico de elución para cada una de las proteínas *ectoEnv* (A) y *ectoEnvIm* (B). Las fracciones obtenidas en la purificación fueron evaluadas por SDS-PAGE. (C) Para el caso de la proteína *ectoEnvIm*, se realizó una identificación mediante espectrometría de masa, MALDI TOF-TOF. En gris se muestra la secuencia correspondiente a gp51 y en naranja *ectogp30*. Dentro de esta secuencia en verde se señala el dominio de inmunosupresión. Los péptidos identificados se muestran en rojo y representan un 60% de cobertura. Se señala también el sitio de corte por enteroquinasa (EK), y los dos strep tag (ST). M: marcador de peso molecular (Page Rule prestained, Thermo Scientific).

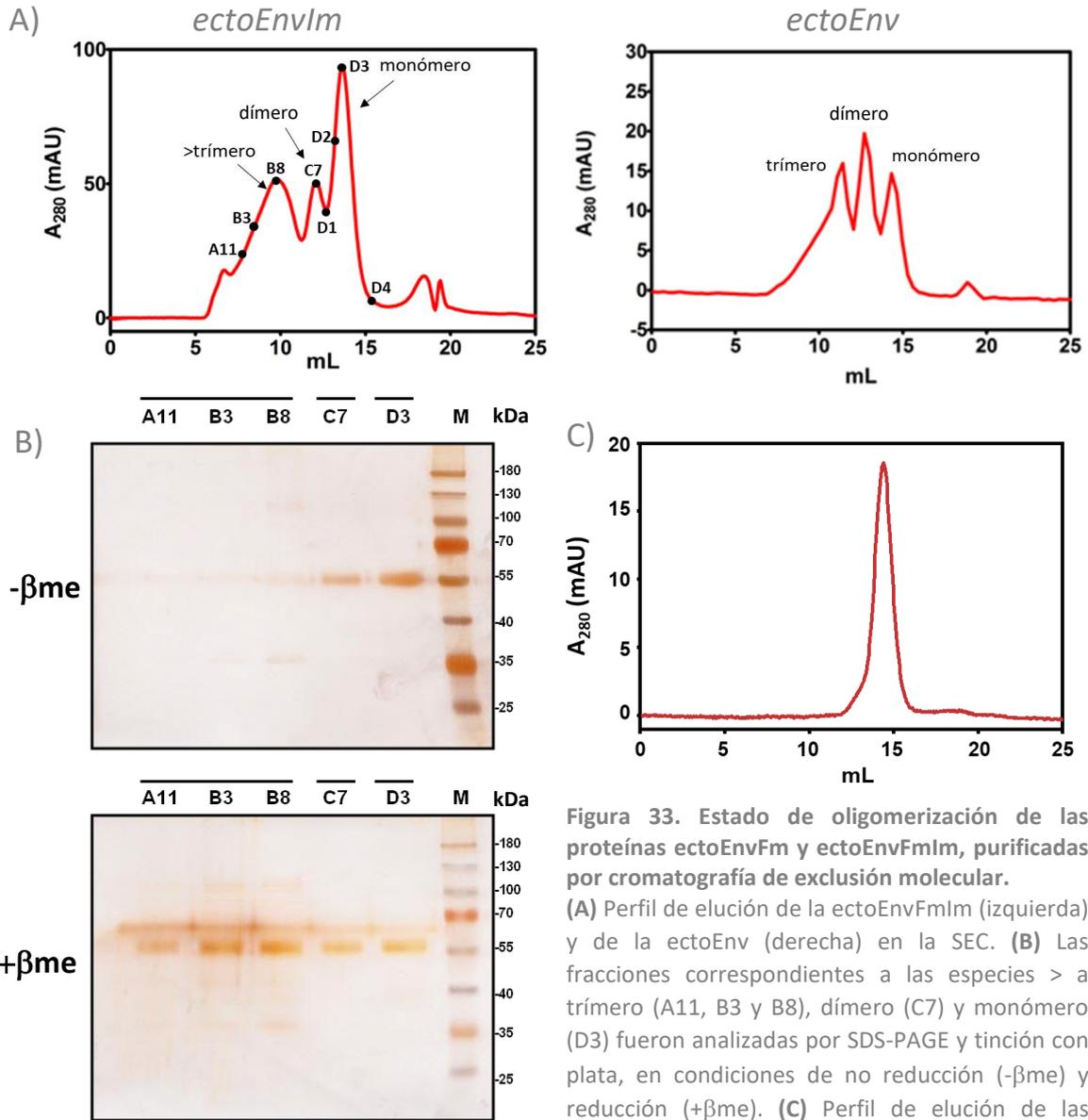


Figura 33. Estado de oligomerización de las proteínas *ectoEnvFm* y *ectoEnvFmIm*, purificadas por cromatografía de exclusión molecular. (A) Perfil de elución de la *ectoEnvFmIm* (izquierda) y de la *ectoEnv* (derecha) en la SEC. (B) Las fracciones correspondientes a las especies > a trímero (A11, B3 y B8), dímero (C7) y monómero (D3) fueron analizadas por SDS-PAGE y tinción con plata, en condiciones de no reducción ($-\beta me$) y reducción ($+\beta me$). (C) Perfil de elución de las fracciones D1, D2 y D4, correspondientes la especie monomérica en SEC. M: marcador de peso molecular (Page Rule prestained, Thermo Scientific).

En la fracción D3, como era de esperar, también se observó la banda de 55 kDa. En condiciones de reducción se pudo observar una banda de 55 kDa correspondiente a *ectoEnvFmIm*, en todas las fracciones. En las fracciones A11, B3 y B8 se observó una banda de tamaño de *ectoEnvFmIm*, indicando que estos oligómeros de mayor tamaño están formados por dicha proteína. Las fracciones de elución D1, D2 y D4, correspondientes al pico del monómero, se juntaron y se pasó nuevamente por la columna. En el perfil de elución se observó un solo pico, lo cual nos indicó que el monómero es estable y permanece inalterado, no ocurriendo un desplazamiento del equilibrio a la especie trimérica al ser purificado en forma individual (Figura 33.C).

7.2.3 ANALISIS DE LA RESPUESTA INMUNE

Para evaluar la respuesta inmune generada por las proteínas ectoEnvFm (a partir de ahora le llamaremos WT) y ectoEnvIm (a partir de ahora le llamaremos MUT), se inmunizaron ratones BALB/c con 10 µg de cada una de las proteínas purificadas Figura 34. Se tomaron muestras de suero a los 0, 7, 21, 35, 49, 64, 73, 84, 96 y 113 días post inmunización para la detección de anticuerpos específicos mediante ELISA, y su capacidad neutralizante se evaluó mediante el ensayo de inhibición de la formación de sincicios. Para analizar la respuesta de células T, a partir de los bazo de los ratones inmunizados se extrajeron los esplenocitos, los cuales fueron re estimulados ex vivo para evaluar la respuesta de células T y la producción de citoquinas.

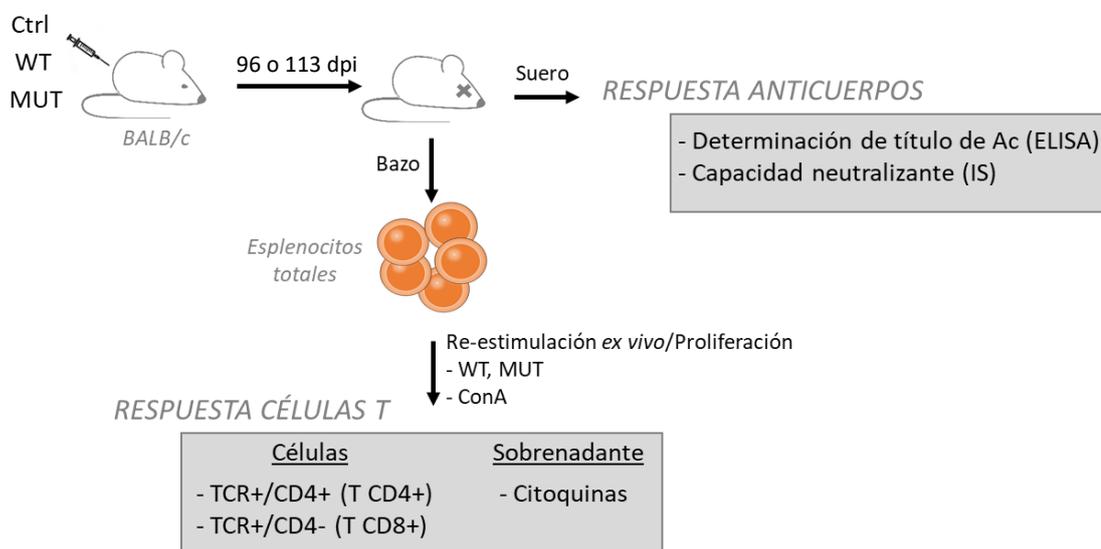


Figura 34. Análisis de la respuesta inmune frente a las proteínas ectoEnv y ectoEnvIm.

Se inmunizaron ratones BALB/c con las proteínas purificadas ectoEnv (WT) o ectoEnvIm (MUT) y a los 96 o 113 días post inmunización (dpi) los ratones se sacrificaron. Se extrajo el suero para el análisis del título de anticuerpos y determinar su capacidad neutralizante. Para el análisis de la respuesta de células T, se extrajo el bazo de los animales inmunizados y se evaluó la proliferación de células TCD4+ y CD8+, así como también el perfil de citoquinas.

7.2.3.1 RESPUESTA INMUNE HUMORAL

7.2.3.1.1 Determinación del título de anticuerpos IgG totales específicos anti-ectoEnv

Los sueros obtenidos a los días 0, 7, 21, 35 y 49 post inmunización, fueron analizados en distintas diluciones desde 1/1000, 1/5000, 1/25000 hasta 1/125000 (Figura 35 B y C). El título de anticuerpos IgG específicos totales se determinó como la última dilución mayor a la mediana de la densidad óptica (DO) de los sueros pre-inmunes + 3 desviaciones estándar (DS). Se puede apreciar que luego del día 14 (Booster 1) hay un incremento en el título de anticuerpos en ambos grupos, el cual parecería llegar a una meseta luego del

día 35. El título de anticuerpos es mayor en los sueros de los animales inmunizados con la proteína WT respecto a los inmunizados con la proteína MUT. Luego del segundo Booster al día 21, el título de anticuerpos en los sueros de animales inmunizados con WT es 5 veces mayor que el de los MUT. Llegando a un pico del día 35 con un título de 1/125000 para WT y 1/25000 para MUT.

Para el análisis de la durabilidad de los anticuerpos IgG totales a lo largo de los 113 días del experimento de inmunización, se realizó un ELISA con los sueros extraídos los días, 0, 7, 21, 35, 49, 64, 73, 84, 96 y 113 (total de días del experimento) con una dilución 1/5000. Luego del Booster 2 (Día 28), se alcanzó el valor máximo de DO en ambos grupos (WT y MUT) a partir del cual se llega a una meseta que se mantiene hasta el día 113 post-inmunización (casi tres meses después del Booster 2). Se puede observar que luego del Booster 3 (Día 42) no parece haber un efecto en el aumento de los anticuerpos totales en ninguno de los dos grupos, WT y MUT. En el grupo control (inmunizado con PBS) no se observó respuesta IgG específica.

7.2.3.1.2 Determinación de la capacidad neutralizante

La capacidad funcional de los anticuerpos anti VLB, es decir la capacidad de los anticuerpos de neutralizar al virus en general es analizado mediante el ensayo de inhibición de sincicios [207–209]. Para llevar a cabo este análisis nuestro primer desafío fue poner a punto el ensayo de formación de sincicios. El ensayo de formación de sincicios consistió en co-cultivar una línea celular a la cual llamamos “donadoras” de factor de fusión (en nuestro caso la línea celular FLK) y una línea celular “aceptora” de factor de fusión (línea celular CC81) [207, 208, 210–213]. En la puesta a punto el ensayo, se evaluaron distintas relaciones de co-cultivo entre las células FLK y las CC81 (1:1, 1:2 y 1:4) [207], manteniendo el número total de células constante. A las 24 hrs de co-cultivo, se observaron sincicios en todas las relaciones de células evaluadas, considerando como un sincicio a aquellas células multinucleadas con más de 4 núcleos. En la relación 1FLK:4CC81, se observó mayor cantidad de sincicios y con mayor número de núcleos (más de 40 núcleos en algunos casos) (**Figura 36 A, B y C**), por lo que en los siguientes experimentos se trabajó con la relación 1FLK:4CC81.

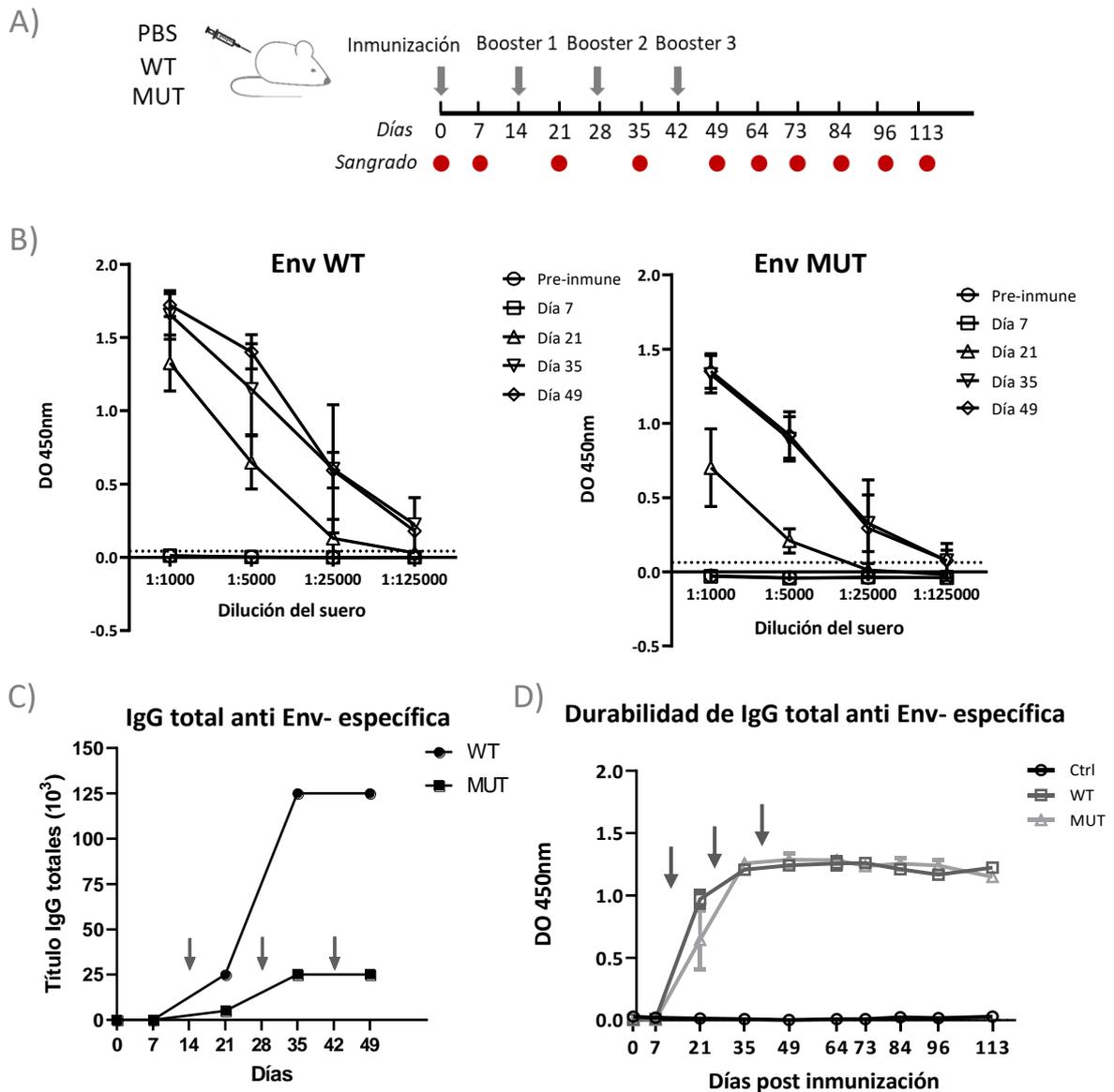


Figura 35. Respuesta inmune humoral generada frente a las proteínas ectoEnv y ectoEnvIm.

(A) Se muestra el esquema de inmunización llevado a cabo. Se indica la duración del experimento en días (113), los tiempos de sangrados (círculo rojo) y los boosters administrados (flechas grises). En el experimento se utilizaron ratones BALB/c de 6-8 semanas de vida ($n=4/\text{grupo}$) y la vía de inmunización fue subcutánea. **(B)** La determinación del título de anticuerpos IgG específicos anti-ectoEnv en los sueros de los ratones inmunizados se realizó mediante ELISA indirecto ($n=4/\text{grupo}$). Las placas se sensibilizaron con la proteína ectoEnv y los sueros extraídos a los días 0, 7, 21, 35 y 49 se analizaron por triplicado a distintas diluciones (1:1000, 1:5000, 1:25000 y 1:125000). **(C)** Título de anticuerpos IgG específicos se determinó como la última dilución del suero hiperinmune con D.O superior a la media+3DS del suero pre-inmune. **(D)** Persistencia en el tiempo de los anticuerpos IgG presentes los sueros de los ratones inmunizados con la proteína ectoEnv y ectoEnvIm.

Para la puesta a punto del ensayo de inhibición de sincicios se emplearon sueros bovinos positivos para VLB, por una cuestión de disponibilidad de volumen de suero. Para ello se utilizaron dos sueros bovinos positivos previamente testados por ELISA (sueros 2723 y 2725 con una DO de 1,62 y 2,02, respectivamente). Se analizaron diferentes diluciones de suero (1/5, 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80) las cuales se incubaron con las células FLK durante 1 hr a 37°C, y luego se mezclaron con las células CC81 en una relación 1:4 respectivamente e incubaron durante 24 hr. En la **Figura 37 A** se puede observar el recuento de los sincicios en presencia de suero y en los controles, para cada una de las réplicas. El cálculo del % de inhibición de sincicios (%IS) se realizó según la ecuación que se muestra en la **Figura 37 A** [207].

Los sueros bovinos positivos para VLB fueron capaces de inhibir la formación de sincicios en un 99 y 95 % a una dilución 1/5. A medida que los sueros se diluyen, se pueden notar diferencias entre ellos, el suero 2723 (DO 1,62) a una dilución de suero 1/40 es capaz de inhibir un 81% la formación de sincicios, mientras que el suero 2725 (mayor DO 2,02), el porcentaje de inhibición de la formación de sincicios a la misma dilución fue del 53%. El suero 2725 parece tener una caída más rápida a medida que se diluye respecto al suero 2723. En estos dos sueros analizados el resultado de % IS no se correlaciona con el título de anticuerpos totales **Figura 37 B y C**. Para el caso del suero bovino VLB negativo, se puede observar que posee una cierta actividad neutralizante %IS 43 **Figura 37 B y C**.

Estas diferencias en la capacidad de inhibir la formación de sincicios han sido previamente reportadas. En un trabajo realizado por Greig et al., donde evaluaron mediante diferentes técnicas la capacidad neutralizante de sueros positivos para VLB, observaron diferencias en la capacidad de inhibir la formación de sincicios en los sueros positivos. Aquellos sueros positivos provenientes de bovinos con linfosarcoma eran capaces de inhibir la formación de sincicios, mientras que aquellos sueros positivos provenientes de animales con linfocitosis no inhibían completamente la formación de sincicios [209].

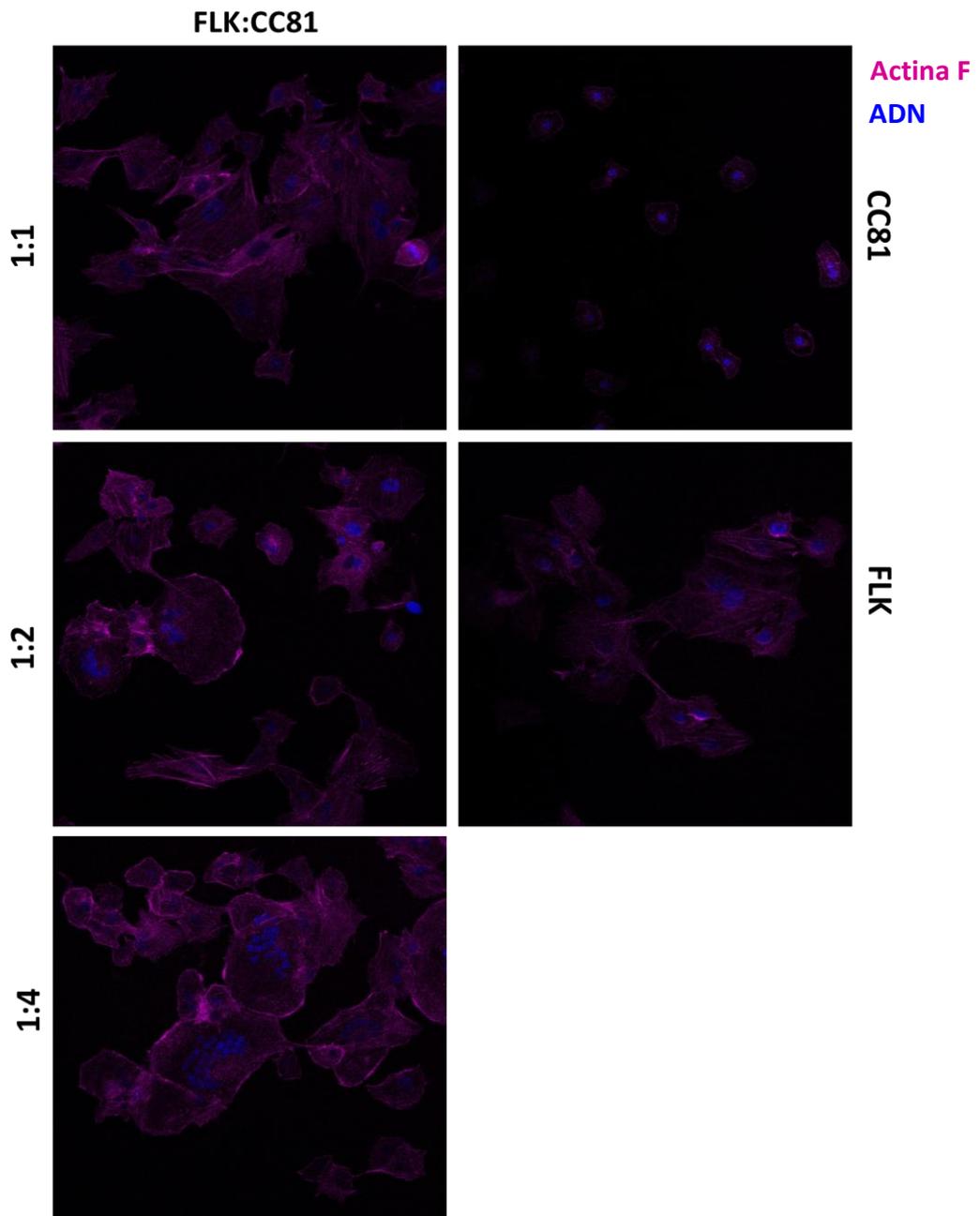
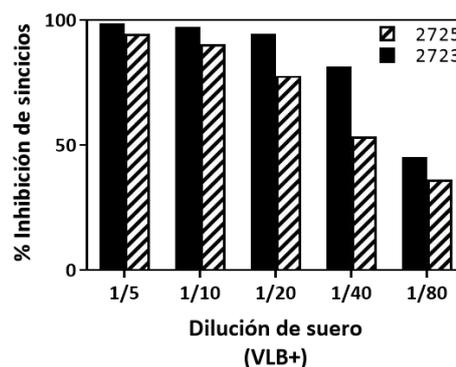


Figura 36. Puesta a punto de la formación de sincicios entre células FLK y CC81.

Imágenes representativas de la formación de sincicios como resultado de 24 hrs de co-cultivo entre células FLK y CC81 en una relación 1:1, 1:2 y 1:4.

A)

Suero	Dilución	Rep.1	Rep.2	Rep.3	% IS
2723	1/5	5	0	0	98,78
	1/10	4	3	4	97,31
	1/20	11	3	8	94,62
	1/40	37	25	14	81,42
	1/80	57	82	85	45,23
2725	1/5	6	7	9	94,62
	1/10	10	11	18	90,46
	1/20	42	33	16	77,75
	1/40	56	74	60	53,55
	1/80	79	87	95	36,19
Sin suero		Rep.1	Rep.2	Rep.3	
FLK-CC81	N.A	137	152	120	N.A
CC81	N.A	0	0	0	N.A
FLK	N.A	0	0	0	N.A



$$\% IS = \left[1 - \frac{\text{Promedio N}^\circ \text{sincicios por pocillos con suero}}{\text{Promedio N}^\circ \text{sincicios por pocillos sin suero}} \right] \times 100$$

B)

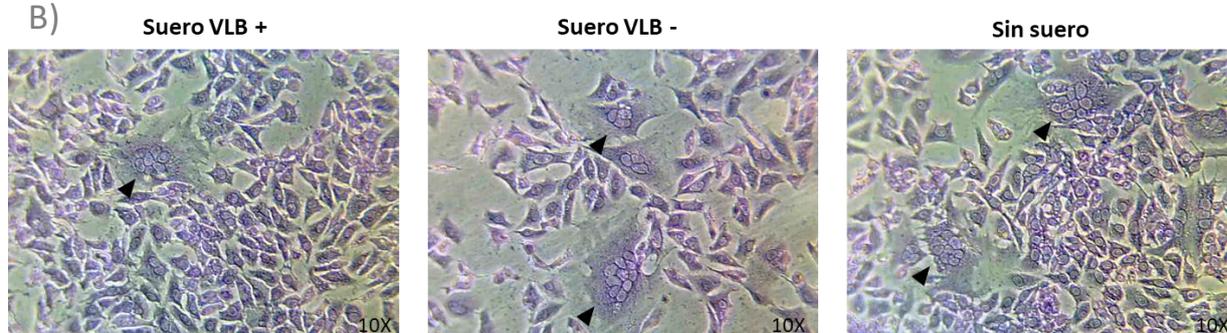


Figura 37. Evaluación de la capacidad neutralizante de sueros bovinos mediante ensayo de inhibición de sincicios. (A) Cálculo de % de Inhibición de sincicios (%IS) para los sueros bovinos analizados [128]. Células FLK-BLV fueron incubadas durante 1 hr a 37°C con distintas diluciones de sueros VLB +. La mezcla del suero y FLK-BLV se co-cultivo con células CC81, en una relación 1:4, respectivamente. A las 24 hrs de cultivo, las células se tiñeron con Giemsa, y se realizó el recuento del número de sincicios por pocillo para cada condición y por triplicado y se determinó el %IS. Cada barra en el grafico representa el promedio de las 3 réplicas, para cada una de las diluciones correspondiente a cada suero. Se contaron los sincicios con más de 4 núcleos en 20 campos. **(B)** Imágenes representativas de sincicios con una dilución de suero de 1/40. Aumento 10X.

La evaluación de la capacidad neutralizante de los sueros de los ratones inmunizados con las proteínas WT y MUT, se realizó mediante el ensayo de inhibición de la formación de sincicios en las mismas condiciones que el realizado para la evaluación de los sueros bovinos utilizando una única dilución de 1/40 de cada uno de los sueros. En el ensayo se analizaron los sueros pre inmunes y los correspondientes a la extracción final de dos ratones inmunizados con WT y dos con MUT. Se incluyó también un suero de un animal control (inmunizado con PBS) y un suero de un ratón BALB/cj externo al experimento, así como también los sueros bovinos positivos para VLB previamente analizados. Como se puede apreciar en la **Figura 38 A y B**, el suero de los ratones inmunizados con la proteína WT y MUT mostraron una respuesta inmune humoral con capacidad neutralizantes, %IS 79,5 y 93%, respectivamente.

A)

Suero	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	%IS
VLB+ (2725)	1	2	2	2	97
VLB+ (2723)	1	3	0	1	98
VLB- (2527)	42	29	35	35	43
BALB/cj (-)	24	31	13	23	63
Suero pre-inmune					
WT (R4)	0	0	-	0	100
WT (R7)	0	0	0	0	100
MUT (R8)	0	3	1	2	97
MUT(R30)	0	0	0	0	100
PBS	0	0	0	0	100
Suero final					
WT (R4)	12	9	8	10	84
WT (R7)	16	17	14	16	75
MUT (R8)	0	5	4	3	95
MUT(R30)	3	5	9	6	91
PBS	6	4	3	4	93
Sin suero					
FLK	0	0	0	0	NA
Vero	0	0	0	0	NA
FLK:Vero	62	69	54	62	NA

B)

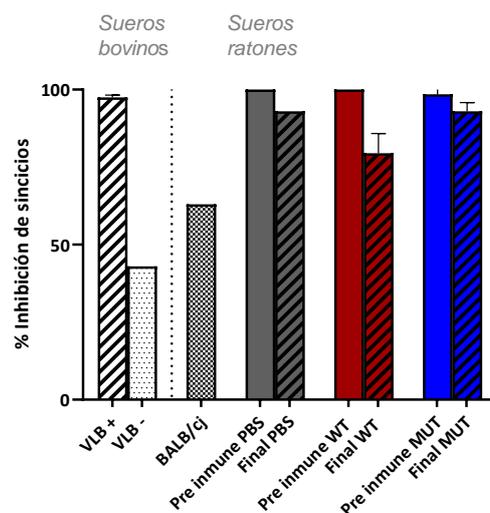


Figura 38. Evaluación de la capacidad neutralizante de sueros de ratones mediante ensayo de inhibición de sincicios.

(A) Células FLK-BLV fueron incubadas con una dilución 1/40 de suero previamente deplementado durante 1 hr a 37°C. Posteriormente la mezcla FLK-BLV/ suero (bovino o de ratón) se co-cultivó con células CC81, en una relación 1:4, FLK-BLV y CC81. A las 24 hrs de cultivo, las células se tiñeron con Giemsa, y se realizó el recuento del número de sincicios por pocillo para cada condición y por triplicado. El cálculo de % de Inhibición de sincicios se determinó según la fórmula que se muestra en la Figura 37 A. Se utilizaron los sueros de ratón correspondientes al sangrado final. Los sueros bovinos utilizados fueron previamente testeados por ELISA (VLB+:2725 y 2723, VLB-:2527). Se incluyó además un suero de un ratón BALB/c sin inmunizar. Se utilizaron dos sueros de ratones inmunizados con WT y dos sueros de ratones inmunizados con MUT. **(B)** Gráfico donde se muestra el %IS para cada uno de los sueros analizados. Para el caso de los sueros VLB+, WT y MUT el %IS es el reflejo del promedio de los dos sueros analizados.

Sin embargo, también observamos una fuerte actividad neutralizante en el suero pre-inmune y en un suero control negativo, obtenido de un ratón BALB/c.

Por otra parte, el resultado obtenido en el ensayo de inhibición de formación de sincicios para el ratón control (inmunizado con PBS) no coincide con el resultado obtenido en el ELISA, en el cual el suero del ratón control no tiene anticuerpos específicos anti-Env. Este resultado no esperado podría deberse a que en el ELISA nosotros detectamos anticuerpos de tipo IgG, mientras que en el experimento de inhibición de sincicios otro tipo de anticuerpos podrían estar jugando un papel en la inhibición.

Esto podría ser un efecto de la dilución de suero utilizada (1/40), tal vez a mayores diluciones podríamos ver diferencias entre WT y MUT. El hecho de ver efecto de inhibición en el suero del animal control (inmunizado con PBS + adyuvante), nos dice que tal vez tenemos un efecto adyuvante, que si hacemos diluciones mayores tal vez sean menos evidentes y de esta manera poder ver diferencias entre WT y MUT. En un trabajo realizado por Schroeder et al., en el cual utilizaron como adyuvante aluminio, vieron que el suero de los ratones control (inmunizados solo con aluminio) era capaz de neutralizar al virus HIV en un

54%, mientras que el suero de los ratones inmunizados con la proteína recombinante Env de HIV + aluminio, el % de neutralización viral fue de 48%. Notaron además que cuando se utiliza solo el aluminio es capaz de inducir varias citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-5 y IL-6. Proponen que el uso del aluminio al igual que otro tipo de adyuvantes, como por ejemplo el pristano, inducen un entorno proinflamatorio que promueve a las células B poli/autorreactivas, capaces de secretar autoanticuerpos capaces de neutralizar el VIH-1 [214].

Los anticuerpos naturales (nAb) son inmunoglobulinas presentes en individuos sanos (en humanos, ratones, ratas, conejos, peces) sin la inducción previa con antígenos o mitógenos. Predominantemente son del tipo “nIgM” (natural IgM) y con menor frecuencia nIgG (natural IgG) e nIgA (natural IgA) [215], [216], [217], [218], [219], [220]. Las nIgM son de carácter polireactivo y son reconocidos como la primera línea de defensa contra las infecciones frente a diferentes agentes patógenos [215], [221]. Estos nAbs proporcionan protección frente las infecciones virales dirigiendo los complejos virus-anticuerpo al bazo y contribuyendo a la resolución de las fases agudas de algunas enfermedades virales. Ratones deficientes en nIgM son más susceptibles a infecciones como resultado de falta de eliminación de patógenos, disminución del reclutamiento de neutrófilos, y citoquinas séricas proinflamatorias elevadas [221]. En este sentido, se ha demostrado que ratones crecidos en condiciones libres de patógenos poseen nIgM en suero, con especificidad frente a antígenos con los que no han tenido nunca contacto [216], [222]. Por ejemplo el virus de estomatitis vesicular, virus de la coriomeningitis linfocítica, influenza virus, *Streptococcus pneumoniae* y *Cryptococcus neoformans* [215], [221].

Otra explicación a la capacidad neutralizante de los sueros de los ratones control, podría ser presencia de nAb anti-Env de retrovirus endógenos en el suero de los ratones BALB/cj. Los retrovirus endógenos murinos de tipo C se han relacionado a la etiología de linfomas espontáneos o leucemias de ratones, por lo que las respuestas citotóxicas naturales, contra una proteína estructural del virus, podrían tener una función de vigilancia en el ratón [223]. Se sabe también que retrovirus endógenos murinos como MLV provocan respuestas de anticuerpos en los huéspedes, siendo las nIgM anti-RV cebadores en la mediación de respuestas inmunes humorales a retrovirus exógenos relacionados. Se encontró que tanto pacientes seronegativos inmunodeprimidos como seropositivos para HIV-1 poseen altos niveles de nIgM anti-RV, respecto a las IgG, cuya especificidad fue demostrada mediante ensayos de inhibición [224].

Por lo que una posible explicación a esta capacidad neutralizantes presente en el suero de ratones control (PBS + adyuvante) y BALB/cj podría ser la presencia de anticuerpos nIgM poli reactivo en el suero de ratones. Esta podría ser una explicación también del porque los ratones no son capaces de infectarse con VLB. Lamentablemente no contamos con suficiente suero para poder repetir los experimentos probando todas las hipótesis discutidas. Quizá la dilución 1/40 resultó demasiado concentrada y en realidad

podríamos estar observando el efecto pro-Zona. Sería de máximo interés poder repetir estos experimentos analizando diluciones seriadas de los títulos.

7.2.3.2 RESPUESTA INMUNE CELULAR

Se analizó la respuesta inmune celular inducida y el efecto de las mutaciones en el ISU en ratones inmunizados con las proteínas WT y MUT. Los esplenocitos obtenidos a partir de los bazo de los ratones inmunizados fueron re estimulados *ex vivo* con distintas concentraciones de proteína ectoEnv WT (0, 1, 10, 20, 50 y 100 µg/mL) y con ConA (control +). Luego de 3 días de incubación, se recuperaron las células y el sobrenadante.

7.2.3.2.1 Análisis de la proliferación de células T

Para el análisis de la **proliferación de células T**, las mismas se marcaron con un mix de TCR-FITC y CD4-PECy7, marca que permite diferenciar linfocitos T CD4+ (TCR+/CD4+) de los T CD8+ (TCR+/CD4-) respectivamente. Frente al estímulo con la proteína WT, no se observó una diferencia en la proliferación de células TCD4+ entre los esplenocitos re estimulados y sin estimular (control negativo) en ninguno de los tres grupos de ratones **Figura 39 A der**. En cuanto a las células T CD8+, se observó una proliferación en los esplenocitos estimulados con la proteína Envwt en los tres grupos, respecto a los esplenocitos sin estimular (**Figura 39 A izq.**). Por otra parte, se observó una diferencia en la proliferación de los esplenocitos de ratones inmunizados con WT respecto a los con MUT. Este resultado concuerda con lo observado en la respuesta humoral, en donde observamos un mayor título de anticuerpos en los sueros de los ratones inmunizados con WT respecto a MUT. Otros experimentos son necesarios, como por ejemplo evaluar otros tiempos de proliferación o evaluación de distintas dosis, para poder determinar si hay una diferencia en la proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados con WT respecto a MUT.

7.2.3.2.2 Análisis de la producción de citoquinas

En este trabajo además de estudiar la respuesta inmune humoral y celular, nos propusimos estudiar el **perfil de las citoquinas liberadas** por los esplenocitos estimulados con las proteínas WT y MUT, con el fin de ver si existen diferencias entre sí, y si la proteína MUT con mutaciones en ISU induce la expresión de citoquinas inmunosupresoras. Para ellos analizamos el sobrenadante de los esplenocitos de ratones inmunizados mediante citometría utilizando el Kit LEGENDplex™ Mouse Inflammation. En el análisis se incluyeron las muestras correspondientes a los ratones inmunizados con PBS (control), WT y MUT re-estimulados con 10 µg de proteína WT y sin re-estimular. Por otra parte también se incluyeron los re-estimulados con ConA (control positivo).

De manera general los resultados obtenidos en la cuantificación mostraron que ninguna de las muestras analizadas superó el rango lineal del ensayo, más bien todo lo contrario, en muchos casos quedó por

debajo del límite de cuantificación (**AnexoII. Tabla S 2, AnexoII. Tabla S 3**), en comparación con las curvas estándar para todas las citoquinas analizadas (**AnexoII.Figura S 9**).

Para el caso de los sobrenadantes de los esplenocitos estimulados con **Con A (control positivo de estimulación)** se observó un aumento en la producción de citoquinas en tres grupos de ratones (PBS, WT y MUT) (**AnexoII.Figura S 10**). La Con A es una lectina que se une de manera irreversible a las glicoproteínas en la superficie celular actuando como un estímulo no específico de las células T y tiene como resultado la activación, proliferación y diferenciación de las células T CD4+ y T CD8+ [225]. En este sentido esperaríamos que el nivel de producción de citoquinas por los esplenocitos de los tres grupos (PBS, WT y MUT) fueran similares frente al estímulo con la Con A, sin embargo, observamos que el nivel que aquellos esplenocitos derivados de los animales control (PBS), fueron más sensibles a la producción de citoquinas cuando son estimulados con ConA, respecto a los esplenocitos derivados de los ratones inmunizados con la proteína WT y la MUT (PBS>WT>MUT).

Varios trabajos reportaron que PBMC derivados de animales con LP cuando eran estimulados con ConA eran más sensibles a la producción de citoquinas en comparación con PBMC derivados de animales AL o negativos para VLB [77–79]. Estos resultados *in vitro* sugieren que las PBMC de animales con LP son más sensibles a la estimulación con ConA que los PBMC de animales sin infectar. En otro trabajo vieron que linfocitos CD4 + aislados bovinos con LP producen menos IL-2 e IL-4, y la expresión de IL-2 e IL-4 fue similar entre bovino no infectados y con LP luego de ser estimulados con ConA [166]. Estos resultados sugieren que los PBMC de animales con LP son más sensibles a la estimulación *in vitro* respecto a los PBMC de animales no infectados con VLB.

En cuanto a los sobrenadantes de los **esplenocitos re estimulados con la proteína WT**, se pudo observar un aumento en la expresión de las citoquinas respecto a los esplenocitos sin estimular de los tres grupos PBS, WT y MUT **Figura 39 B**. En cuanto a los sobrenadantes de los esplenocitos de los ratones inmunizados con PBS, se puede observar que hay un aumento en la producción de las citoquinas, inclusive en algunos casos, el nivel de citoquinas fue mayor o similar a lo observado para WT o MUT, tal es el caso por el TNF- α y la IL-6. Este resultado, se puede explicar por el hecho de que contamos con una población heterogénea de células, dentro de las cuales están presentes las células NK. Estas células, son capaces de reconocer directamente proteínas (en este caso la ectoEnv) y activarse y producir citoquinas.

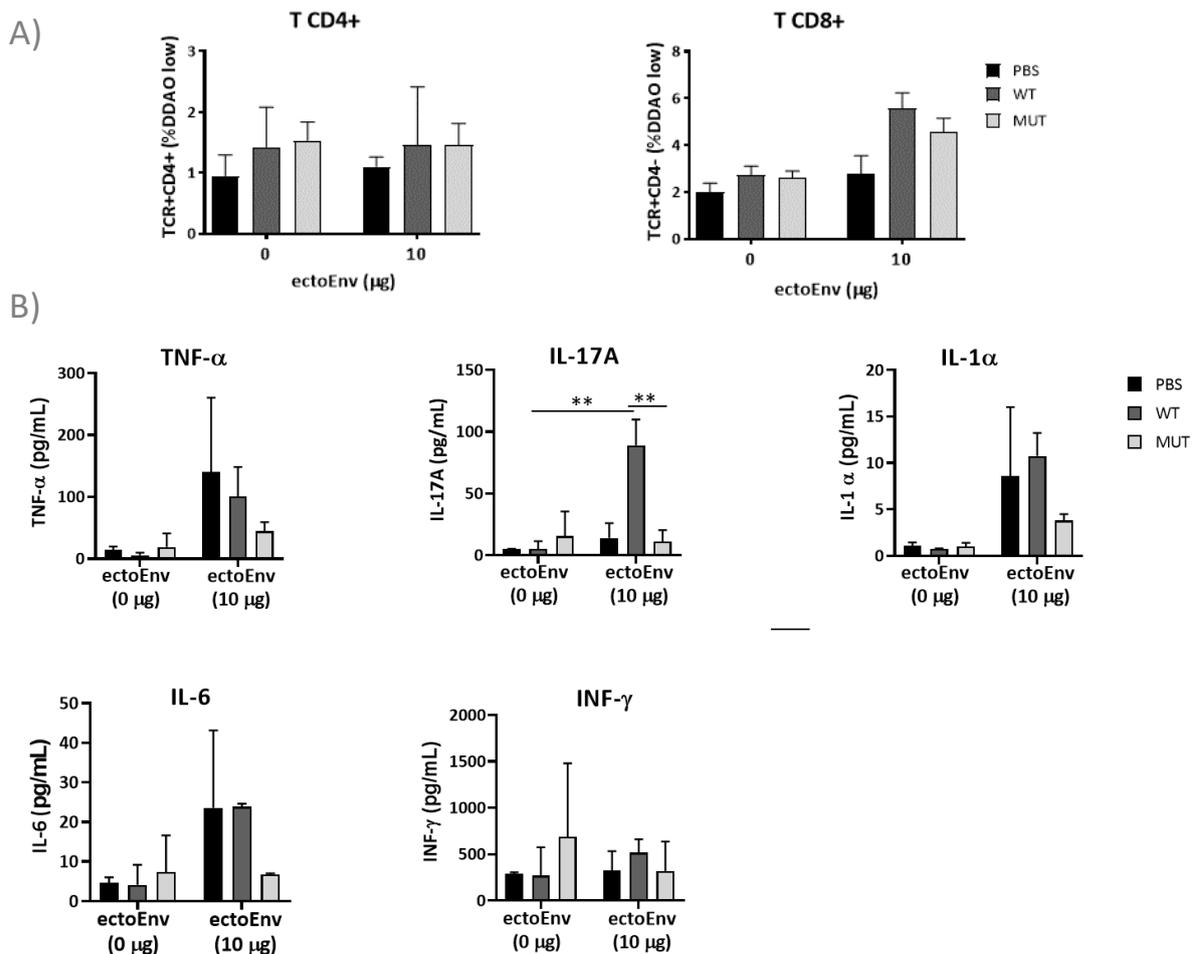


Figura 39. Re-estimación *ex vivo* de células T en respuesta a la proteína WT.

Se realizó un ensayo de proliferación con los esplenocitos obtenidos a partir del bazo de los ratones inmunizados. Los esplenocitos fueron incubados con DDAO, y re estimulados con concentraciones crecientes de ectoEnv (0,1, 10, 20, 50 y 100 µg/mL). Luego de 3 días de incubación, se separaron las células y el sobrenadante. **(A)** Las células se marcaron con un de TCR-FITC (1/1000) y CD4-PECy7 (1/1000) y se analizaron por citometría de flujo. La proliferación de las células T CD4 + (der.) y T CD8+ (izq.), sin estimular y estimulado con 10 µg de proteína WT. **(B)** La producción de citoquinas en el sobrenadante de los esplenocitos re estimulados con ectoEnv fueron analizadas utilizando el kit LegendPlex Mouse Inflammation Panel (Biolegend) y medidas por citometría. Se analizaron los esplenocitos sin estimular (0 µg WT), los estimulados con 10 µg de proteína WT. Para cada valor se representa el promedio del valor de proliferación de células T correspondiente a dos ratones de cada grupo (N=2). Se compararon todos los grupos entre si utilizando el análisis one-way ANOVA análisis con el test de múltiple comparación Tukey's. Los datos son presentados como la media del grupo ± SD. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Respecto a la **IL-6** se pudo ver que en aquellos sobrenadantes de esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con WT y re estimulados con la misma proteína, producen una mayor cantidad de esta citoquina respecto al MUT (3,5 veces más).

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que se produce en respuesta al daño tisular o frente a las infecciones. Esta citoquina juega un papel fundamental en la activación y regulación de la respuesta inmune, teniendo un rol tanto pro inflamatorio como anti inflamatorio [226]. Estudios clínicos en humanos y animales

también han relacionado el aumento de los niveles sistémicos de IL-6 con la exacerbación de los resultados clínicos que involucran patógenos virales. El análisis del transcriptoma de los tejidos faríngeos de ganado persistentemente infectado con el virus de la fiebre aftosa mostró un aumento local de la expresión de IL-6, lo que sugiere que la sobreexpresión de IL-6 podría ser un posible mecanismo que favorezca la persistencia de algunos virus [226].

En un trabajo realizado por Meiom et al., encontraron que los niveles de IL-6 en el suero de bovinos infectados con VLB con LP eran significativamente mayores a los de los sueros de animales positivos para VLB, pero AL o en aquellos sueros de animales VLB negativos. Los mismos resultados obtuvieron cuando analizaron la producción de la IL-6 por PBMC, inclusive luego de su estimulación *in vitro* con la proteína gp51 de VLB [227].

En su rol como citoquina antiinflamatoria, se ha demostrado que la IL-6 interviene en la vía PD-1(programmed death -1)/PD-1L (programmed death -1 ligado). El PD-1 es un receptor inmunoinhibitorio que se expresa en las células T y B activadas, e induce inmunosupresión mediante su unión al ligando PD-1L. La interacción PD-1/PD-1L normalmente trabaja como un regulador negativo del sistema inmune previniendo una respuesta inmune exacerbada [226]. Sin embargo, durante las infecciones crónicas, la unión de PD-1 presentes en las células T a su ligando PD-1L expresado en las células infectadas, altera la respuesta inmune frente a virus previniendo la generación y expansión de células T [226]. Se ha visto una sobre expresión de PD-1 en células T CD8+, las cuales son específicas de HIV, hepatitis B (VHB) y HTLV, por lo que la vía PD-1 parecería ser un mecanismo de evasión del sistema inmune común en muchas infecciones crónicas virales [85]. La sobre expresión de PD-1L también se ha visto en bovinos infectados con VLB [85]. En un trabajo realizado por Ikebuchi et al., observaron que la inhibición de la interacción de PD-1 con su ligando PD-1L, sobre PBMC provenientes de bovinos infectados aumenta la producción de IL-2 e INF- γ , aumentando la función de las células T *in vitro* [85, 228]. Por último respecto a su rol pro inflamatorio, la IL-6 promueve la diferenciación de las células T CD4+ naive a células T colaboradoras de tipo 17 (Th17) [229].

En cuanto a las citoquinas **TNF- α , IL-1 α , IL-17A, INF- γ** , se detectó una mayor cantidad de estas citoquinas en aquellos sobrenadantes derivados de esplenocitos de ratones inmunizados con WT con respecto a los de MUT.

El **TNF- α** es una citoquina pro-inflamatoria secretada principalmente por células del sistema inmune, tales como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T, principalmente CD4+. Su síntesis puede ser inducida por virus, parásitos, bacterias, células tumorales, isquemia, trauma e irradiación, así como por citoquinas tales como el IFN- γ , la IL-1, IL-2, IL-12, el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), el factor activador de plaquetas (PAF) y el mismo TNF- α , que de

manera autocrina puede comportarse como un estímulo para potenciar su producción. Kabeya et al., demostraron que, en fases tempranas de la infección por VLB, hay un aumento de la expresión del ARNm del *TNF- α* en ovejas inoculadas experimentalmente capaces de eliminar el virus en estas primeras fases, y que tanto esta citoquina como sus receptores de superficie (TNFRI y TNFRII) serían responsables de desbalances en los procesos de proliferación y muerte celular, lo que culminaría en el desarrollo de linfocitosis [80]. Nuestros resultados mostraron que hay un aumento de *TNF- α* en aquellos sobrenadantes derivados de los esplenocitos estimulados con la proteína WT, respecto los sobrenadantes de los esplenocitos sin estimular. A su vez hay más en WT que en MUT.

Para el **caso particular de la IL-17A**, interesantemente observamos que los esplenocitos derivados de ratones inmunizados con WT aumentan de manera significativa con respecto a los inmunizados con MUT. La IL-17A es una citoquina proinflamatoria producida por las células colaboradoras tipo 17 (Th-17) (Figura 40), que participa en la regulación de la respuesta inmune frente a varios patógenos incluidos los virus. Estudios recientes sugieren que la IL-17 no solo está involucrada en la respuesta inmune antiviral sino que también promueve enfermedades mediadas por virus [230, 231].

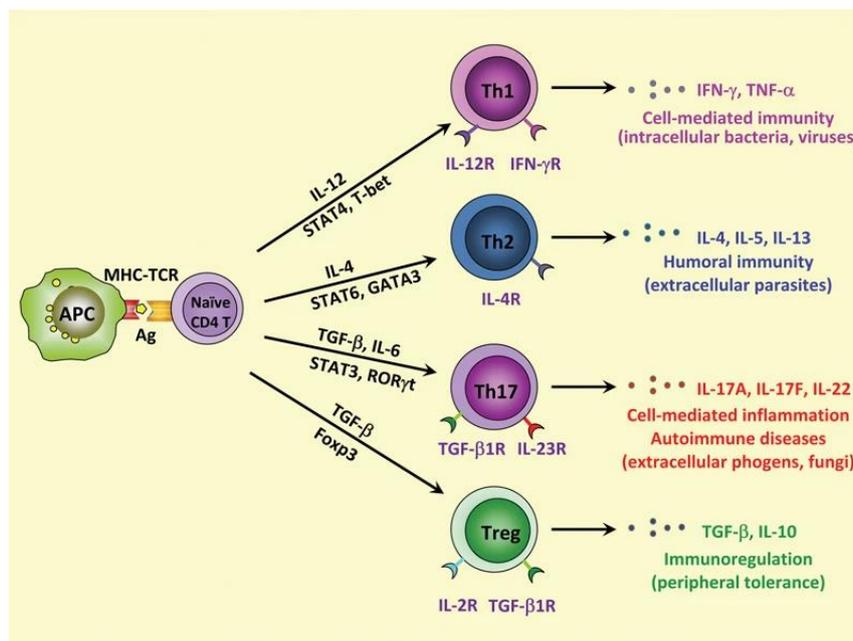


Figura 40. Diferenciación de células T CD4+.

Cuando una célula T CD4+ sin tratamiento previo reconoce una sustancia extraña, se activa y se diferencia en una clase específica de célula T CD4+ madura. Dependiendo del Ag, se producen diferentes citoquinas en el entorno circundante, que son importantes para determinar qué subconjunto de células T CD4+ surge. Cada subconjunto de células T CD4+ produce citoquinas específicas y tiene diversas funciones durante una respuesta inmune. Adaptado de Leung et al. [229].

El **INF- γ** fue detectado en el sobrenadante de los esplenocitos provenientes de ratones estimulados con la proteína WT, y prácticamente no aumenta respecto al sobrenadante de los esplenocitos sin estimular. La expresión de **IFN- γ** es un fuerte indicador de la inmunidad mediada por células y es una citoquina clave en la eliminación de virus. En la infección con VLB, el **INF- γ** es downregulado facilitando la progresión de la enfermedad [80], [83], [232] y se ha demostrado una correlación inversa entre la transcripción del **INF- γ** y la carga proviral en ovejas inoculadas experimentalmente [233], [234].

Por último, si bien no se detectó la **IL-10** en el sobrenadante de los esplenocitos estimulados con ectoEnv en ninguno de los grupos (PBS, WT y MUT), si se detectó en el sobrenadante de aquellos esplenocitos de los ratones inmunizados con WT o PBS y re estimulados con ConA (**AnexoII.Figura S 10**). Los resultados obtenidos van en contra de nuestra hipótesis, ya que la proteína ectoEnv WT no fue capaz de estimular la producción de esta citoquina por parte de los esplenocitos de los ratones inmunizados y deberíamos haber visto una disminución o ausencia en los sobrenadantes de los esplenocitos derivados de los ratones inmunizados con la proteína MUT.

En un trabajo realizado por Ohishi et al., analizaron la respuesta inmune humoral y celular inducida en ratones BALB/c mediante la inmunización con liposomas conteniendo un péptido derivado de gp51 de VLB. Los esplenocitos de los ratones inmunizados fueron estimulados con el respectivo péptido o con partículas de VLB y analizaron la proliferación celular y el tipo de citoquina producida. Pudieron ver que aquellos esplenocitos derivado de los ratones inmunizados con el liposoma conteniendo el péptido de gp51 expresaban grandes cantidades de **INF- γ** e **IL-2** (respuesta Th1), mientras que no detectaron ni **IL-4** ni **IL-10** (respuesta Th2) en ninguno de los sobrenadantes [139, 140].

En VLB se ha descrito que la progresión de la enfermedad está asociada a un cambio en el perfil de citoquinas. En este sentido se ha demostrado que la producción de citoquinas de tipo de respuesta Th1 como es la **IL-2**, es mayor en animales VLB positivos AL respecto a los animales con LP. Por el contrario, un incremento en la expresión de citoquinas Th2 como la **IL-10** se ve aumentada en animales con LP o con tumor [80].

Así mismo este efecto de la proteína Env en la inducción de la **IL-10** ha sido descrita para otros retrovirus [235, 236]. Sin embargo, en un trabajo realizado por Muhle et al., observaron que la proteína recombinante gp41 de HIV, fue incapaz de inducir la liberación de la **IL-10** [237]. Estos resultados, se contradicen con los trabajos previos en los cuales la proteína recombinante gp41 de HIV si fue capaz de inducir la expresión de la **IL-10** [238–240], [241]. En un trabajo realizado por Morozov et al., describen como mutaciones en el ISU son capaces de suprimir la liberación de las **IL-10** respecto a lo que ocurre en la proteína con el ISU nativo [54].

La glicoproteína Env del VLB juega un rol clave en diferentes mecanismos relacionados con la biología de la LBE. Por un lado, es central en la infectividad viral siendo responsable de la unión con el receptor del linfocito B y también de activar la fusión de membranas lo que permite la introducción del genoma viral en su célula blanco. Asimismo, representa uno de los principales blancos de la respuesta inmune antiviral, generando una respuesta adaptativa tanto humoral (anticuerpos neutralizantes) como celular (linfocitos T específicos).

En lentivirus, concretamente en HIV-1, la actividad inmunosupresora del dominio ISU presente en gp41 ha sido demostrada [54]. Al igual que otros retrovirus la infección por VLB resulta en una desregulación del sistema inmune tanto humoral como celular. Este desbalance inmunitario tiene como consecuencia una inmunosupresión con impactos directos en los bovinos, como son el desarrollo de tumores, e impactos indirectos, como son las infecciones secundarias. En este sentido un desbalance inmunológico tiene un impacto negativo en lo que se refiere a la respuesta frente a vacunas [165]. Así mismo una desregulación en el sistema inmune es esperable que afecte la performance productiva de los bovinos infectados, especialmente en tambos de producción intensiva. El estatus sanitario del bovino, determinado en gran parte por la robustez de su sistema inmunológico, resulta especialmente relevante en pos de obtener los mejores niveles productivos.

Uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar el impacto de introducir mutaciones en el dominio de inmunosupresión ISU de Env en la respuesta inmune adaptativa humoral y celular frente a la inmunización de ratones. La respuesta inmune humoral (título de anticuerpos IgG totales y capacidad neutralizante) y celular (respuesta T CD4+ y CD8+) generada fue mayor en aquellos ratones inmunizados con la proteína WT respecto a los inmunizados con la proteína MUT. En el análisis de las citoquinas, pudimos ver que la proteína WT fue capaz de inducir mayores niveles de citoquinas respecto a la proteína MUT. En particular el aumento de la citoquina IL-17A en WT en conjunto con las IL-6 y TNF- α nos da la idea que esta proteína genera una respuesta proinflamatoria orquestada por células Th17. Si bien estos resultados son una primera aproximación, este tipo de respuesta Th17 no ha sido descrita previamente para VLB. Como hipótesis de trabajo inicial nos planteamos que incorporar estas mutaciones en el ISU, disminuirían su actividad inmunosupresora y por lo tanto aumentarían su poder inmunogénico, sin embargo, observamos el efecto contrario.

En un trabajo realizado por Ivanusic et al., demostraron que la conformación y accesibilidad del ISU es crítica para su función biológica. Utilizaron para ello, dos sistemas de expresión, el primero designado pOUT, en el cual proteínas retrovirales conteniendo el ISU son expresadas y liberadas al sobrenadante de cultivo. En el segundo sistema, utilizan la tecnología tANCHOR, en la cual el ISU es presentado por una

secuencia tetraspaning anclada a la membrana celular. Con ambos sistemas se expresó el dominio ISU wt de HIV-1, el ISU de retrovirus endógeno (PERV) y el ISU de la leucemia murina (MuLV), para todos los casos se expresó el ISU mutado. Observaron que cuando las células expresaban el ISU y eran co cultivadas con PBMCs, no incrementaba la producción de IL-10 en comparación con lo observado para el ISU mutante. Resultados similares fueron obtenidos cuando las proteínas TM, eran concentradas por inmunoprecipitación y cultivadas en presencia de PBMCs. La ausencia de la inducción de la IL-10 podría ser explicada, por una baja cantidad de proteína, o por la pérdida de la actividad biológica, por la pérdida de la conformación proteica o por la ausencia de factores adicionales [242].

En nuestro caso, las proteínas WT y MUT fueron caracterizadas por SDS-PAGE, gel filtración, y western blot utilizando un anticuerpo monoclonal específico, mostrando un comportamiento comparable, sin embargo, desconocemos el efecto de las mutaciones en la conformación de la proteína.

Un análisis *in silico* del efecto que tienen las mutaciones que introducimos en el ISU en la conformación de la proteína sería necesario. Por otra parte, tal vez la cantidad de proteína usada en el experimento de estimulación o el diseño del experimento en si no fueron los apropiados.

El estudio en el modelo murino podría ser una primera aproximación para evaluar la respuesta inmune generada por las proteínas WT y MUT. El hecho de que los ratones no se infecten con VLB, nos hace pensar que este no sería el mejor modelo para estudiar el efecto que tiene el ISU en la inmunosupresión, y por tanto tampoco como impactarían mutaciones en la respuesta inmune generada.

El VLB puede transmitirse experimentalmente a varias especies como ovejas, conejos, ratas, pollos, cerdos, cabras y alpacas. En particular la infección de ovejas con VLB, da lugar al desarrollo de linfomas con alta frecuencia y en menor período de tiempo, constituyéndose en un modelo animal más accesible para estudiar los procesos de infección y leucemogénesis [112]. A pesar de esto, ensayos de vacunas en ovejas han demostrado su eficacia en la protección contra el desafío de VLB, y esto se ha correlacionado con una respuesta inmune celular polarizada en Th1 [141], [136]. Sin embargo, en bovinos, la falta de protección en los ensayos de vacunas se correlacionó con una respuesta polarizada Th2 [148]. Interesantemente, los linfocitos B transformados en bovinos son CD5+ IgM+, mientras que en ovinos son células B CD5- IgM+, sugiriendo que el mecanismo de leucemogénesis inducido por el VLB podrían ser diferentes [71]. En este sentido es importante también evaluar el tipo de adyuvante empleado en las formulaciones de vacunas que pueden polarizar el tipo de respuesta hacia Th1 para mejorar la protección anti-viral. La presencia de niveles adecuados de anticuerpos neutralizantes y una fuerte respuesta celular mediada por LTC, son características deseables para una vacuna anti-VLB [149]. Por todo lo anterior, resulta indispensable realizar los estudios de inmunogenicidad en el modelo bovino.

7.3 GENERACIÓN DE UN SISTEMA REPORTERO PARA LA INFECCIÓN POR VLB

La infectividad de VLB comúnmente es medida mediante el ensayo de formación de sincicios. Este ensayo, se basa en el co-cultivo entre una línea celular “aceptora”, la más comúnmente utilizada es la CC81, junto a una línea persistentemente infectada con VLB, la FLK. El resultado del co-cultivo es la formación de células multinucleadas, las cuales se denominan sincicios [209]. Este ensayo tiene la complejidad de que el recuento de los sincicios se hace visualmente, lo cual resulta engorroso ya que depende de un operador entrenado capaz de discriminar lo que es un sincicio de lo que no. Por otra parte, esta metodología es de difícil aplicación en ensayos de screening, tales como, evaluación de la capacidad neutralizante de anticuerpos de múltiples muestras a la vez, medir capacidad infectiva de muestras biológicas o la eficacia de procesos de inactivación de las mismas, así como también evaluación de compuestos con capacidad anti-viral.

Dada la complejidad antes mencionada del ensayo de formación de sincicios tradicional, es que nos planteamos generar un sistema reportero utilizando un sistema lentiviral de segunda generación.

La región 5´LTR presente en el genoma de VLB contiene sitios reguladores de unión a proteínas y es responsable de la integración y replicación del virus. De las tres regiones que conforman el LTR (U3, R y U5), la región U3, contiene tres sitios de respuesta a la unión de la proteína Tax (TxRE), principal regulador de la replicación del VLB [243–245]. En particular, la unión de Tax a sitio TxRE-2 ha sido reportada como el evento regulador predominante de la replicación del VLB [246]. Aún más, la unión de Tax a TxRE es mediado por el elemento de respuesta a AMPc de unión a proteínas, CREB.

Harms et al., evaluaron la expresión de un gen reportero comparando el efecto del uso del LTR de VLB vs CMV como promotor. Los resultados indicaron que el promotor de VLB, aunque tiene una actividad basal baja en comparación con el promotor de CMV, es capaz de ser inducido a niveles altos de actividad similar al promotor de CMV en todas las células analizadas. La infección por VLB o la proteína Tax, mejoraron específicamente la actividad de LTR sin efecto sobre la actividad de CMV. Concluyendo que el promotor de VLB podría ser muy útil para la expresión de un transgén en vectores de expresión de mamíferos [247]. Así mismo, ha sido utilizado previamente en la generación de líneas reporteras de la infección de VLB [247–251]. Previamente el grupo de Yoko Aida et al., desarrollaron un sistema reportero “LuSIA” (luminescence synsytium induction assay), el cual fue generado mediante transfección con un plásmido conteniendo el LTR y el gen reportero EGFP [248], [249]. Sin embargo, la transfección transitoria o estable de células de mamífero está asociada en muchos casos a una eficiencia de transfección limitada o a procesos largos de selección y obtención de líneas celulares clonales [252]. En este sentido, nos planteamos la generación de la línea reportera mediante la transducción lentiviral, el cual es un método

Esto nos permitió conocer en más detalle nuestros sistemas de infección, lo cual es fundamental a la hora de desarrollar el sistema reportero. Algunos aspectos importantes para analizar fueron, capacidad de infectarse mediante la infección con sobrenadante (sin la necesidad del co-cultivo con FLK, “cell free” o libre de células), y la capacidad de formar sincicios. La capacidad de integrarse en forma de provirus y expresar proteínas virales.

7.3.1 INFECCIÓN CON VLB

Como se describió en el punto 6.6.2.2.1, logramos poner a punto la **formación de sincicios mediante el co-cultivo** entre la línea células FLK y la CC81, en una relación 1:4. Nuestro interés en evaluar otra línea celular en particular las Vero, radica en el hecho de que la línea CC81 esta transformada con el virus MSV (murine sarcoma virus) y además de que se reportó que las células derivadas de gato podrían producir bajos niveles del retrovirus endógeno RD114 [254]. En primera instancia se evaluó su capacidad de formar sincicios mediante el co-cultivo FLK. El resultado mostró que las células Vero son capaces de formar sincicios con las FLK, de acuerdo con lo previamente reportado [209]. Sin embargo, se pudo observar que, en comparación con lo observado con las CC81, la cantidad y el tamaño de los sincicios (número de núcleos) fue más discreta, para las mismas condiciones de co-cultivo.

Por otra parte, también evaluamos la **infección de células Vero y CC81 con sobrenadantes** conteniendo partículas virales derivadas de las líneas FLK y BL3.1 y la capacidad de formar sincicios, lo que llamamos “cell free” o libre de células. Una vez más, con la intención de generar un sistema reportero, lo más sencillo posible, basado en la infección de una línea celular (la reportera) directamente con partículas virales, sin la necesidad del co-cultivo. La infección se realizó mediante la adsorción viral durante 1 hr y se evaluó la formación de sincicios retirando (1 hr de adsorción viral) o dejando el inóculo. Luego de 24 hrs de incubación, los cultivos se observaron al microscopio óptico y se tomaron fotos. Se pudo observar que en las infecciones donde no se retiró el inóculo, hubo mayor cantidad de sincicios comparado con aquellas infecciones donde luego de pasada la hora de adsorción, el inóculo se retiró y se lavó la monocapa. Esto se observó en ambas líneas células y con ambos sobrenadantes (**Figura 42**).

Por otra parte, se observó mayor formación de sincicios cuando se usó sobrenadante de FLK en comparación con el de BL3.1, ya sea en las células Vero o en las CC81, y retirando o dejando el inóculo. Parecería que el sobrenadante derivado de la línea celular FLK contiene más partículas virales que el derivado de la línea BL3.1 (**A y B, AnexoII.Figura S 11, AnexoII.Figura S 12**). Este comportamiento fue observado previamente en nuestro laboratorio por Lorena Tomé en su tesis de doctorado, en el cual realizó la purificación de las partículas virales a partir de ambos sobrenadantes [168]. A partir de este

resultado, decidimos usar en las siguientes infecciones sobrenadante de FLK y no retirar el inóculo de infección.

En un trabajo realizado por Suzuki et al., se analizó la capacidad de producir progenie viral de 11 líneas celulares derivadas de mamíferos [253]. Infectaron las líneas celulares con sobrenadante de FLK durante 7 días, y analizaron la producción de progenie y su capacidad de unirse a la línea celular NIH3T3, mediante citometría de flujo. Dividieron estas 11 líneas en dos grupos: células productoras de progenie y células no productoras de progenie. Dentro del grupo de células productoras de progenie se encontraban las células derivadas de bovino BT y MDBK, de murciélago Tb1Lu, de gato CC81 y las humanas HOS. Dentro de grupo no productor de progenie, se encontraban, las células de bovino EBTr, de ratón NIH3T3 y SC-1, de rata NRK, de conejo SIRC y de mono COS7. Para confirmar la capacidad infectiva de la progenie, infectaron células CC81 con sobrenadantes derivados de células infectadas de ambos grupos (BT, MDBK, CC81 y NIH3T3, COS7, SIRC) y evaluaron la formación de sincicios. Observaron que cuando usaron sobrenadantes derivados de células BT o CC81 previamente infectadas, se formaron sincicios en CC81. Sin embargo, cuando se usó sobrenadante de MDBK previamente infectado, no se formaron sincicios en CC81, a pesar de su habilidad de unirse a las células NIH3T3. Para el caso de los sobrenadantes derivados de células no productoras de progenie, en ninguno de los casos se observó la formación de sincicios en las células CC81.

En nuestro caso el hecho de observar sincicios en aquellos cultivos en los cuales se retiró el inóculo luego de la adsorción viral nos permitiría pensar que ambas líneas celulares son capaces de producir progenie viral. A partir de los resultados obtenidos con la línea celular CC81, reconfirmamos lo descrito previamente, que las mismas son capaces de infectarse a partir de sobrenadantes de FLK (“cell free”) y formar sincicios. A pesar de que no lo evaluamos, podemos decir que a partir de su infección se obtienen partículas con capacidad infectiva [253]. Observamos también que las células Vero infectadas con sobrenadantes de FLK formaron sincicios discretos en cuanto a la cantidad de núcleos, en comparación con los que se formaron en las CC81.

Previamente en un trabajo realizado por Graig et al., utilizaron las células Vero para realizar el co-cultivo con FLK, observando la formación de sincicios a las 4hrs de cultivo. Sin embargo, cuando utilizaron sobrenadante de FLK para infectar las Vero, no lograron ver la formación de sincicios, aun luego de 14 días de cultivo, describiéndolas como menos sensitivas[209]. En nuestro caso, a diferencia de lo reportado por Graig, sí logramos ver la formación de sincicios cuando infectamos células Vero con sobrenadante de FLK (**Figura 42**). En la **Tabla 4** se resumen los resultados obtenidos de formación de sincicios cuando se realiza la infección de células Vero y CC81 con sobrenadantes derivados de células FLK y BL3.1, y se compara además la formación de sincicios y el tiempo de incubación del inóculo y la línea celular.

Posteriormente quisimos analizar la **producción de progenie viral** en células Vero infectadas con sobrenadante de FLK. A las 72 hpi, se observaron sincicios y se retiró el sobrenadante de cada botella y se utilizó para infectar nuevas monocapas de células Vero (**AnexoII.Figura S 13**). Este procedimiento se realizó una vez más. En la infección inicial (Infección 1) se pudieron observar muy pocos sincicios, más bien sincicios en donde se pudieron observar máximo 9 núcleos. En el primer pasaje en ciego ya prácticamente no se observó formación de sincicios. Se realizó un segundo pasaje en ciego, en el cual ya no se evidenciaron sincicios. A partir de estos resultados, podemos decir que las células Vero no serían buenas productoras de progenie viral (más restrictivas que las CC81). En este ensayo se incluyó un control de toxicidad, a fin de descartar la posibilidad de que la observación de sincicios se deba a un efecto tóxico causado por el inóculo y no por la infección viral. Para este ensayo se realizaron en paralelo infecciones con sobrenadantes de FLK inactivado. La inactivación fue realizada incubando durante 1 hora a 99°C. La integridad de los virus envueltos se ve afectada por la temperatura. No se observaron sincicios ni en la infección 1 ni en los siguientes 2 pasajes en ciego. Por lo que los sincicios son un efecto de la infección de VLB en las células Vero.

La glicoproteína de envoltura Env del VLB juega un rol clave en la infectividad viral siendo responsable de la unión al receptor y la fusión de la membrana viral y de la célula blanco. Dicha capacidad fusogénica permite formar “sincicios” como consecuencia de la presencia de Env en la superficie de células blanco, ya sea por brotamiento (“*fusion from with in*”) durante la multiplicación viral o fusión (“*fusion from with out*”) de partículas virales [209].

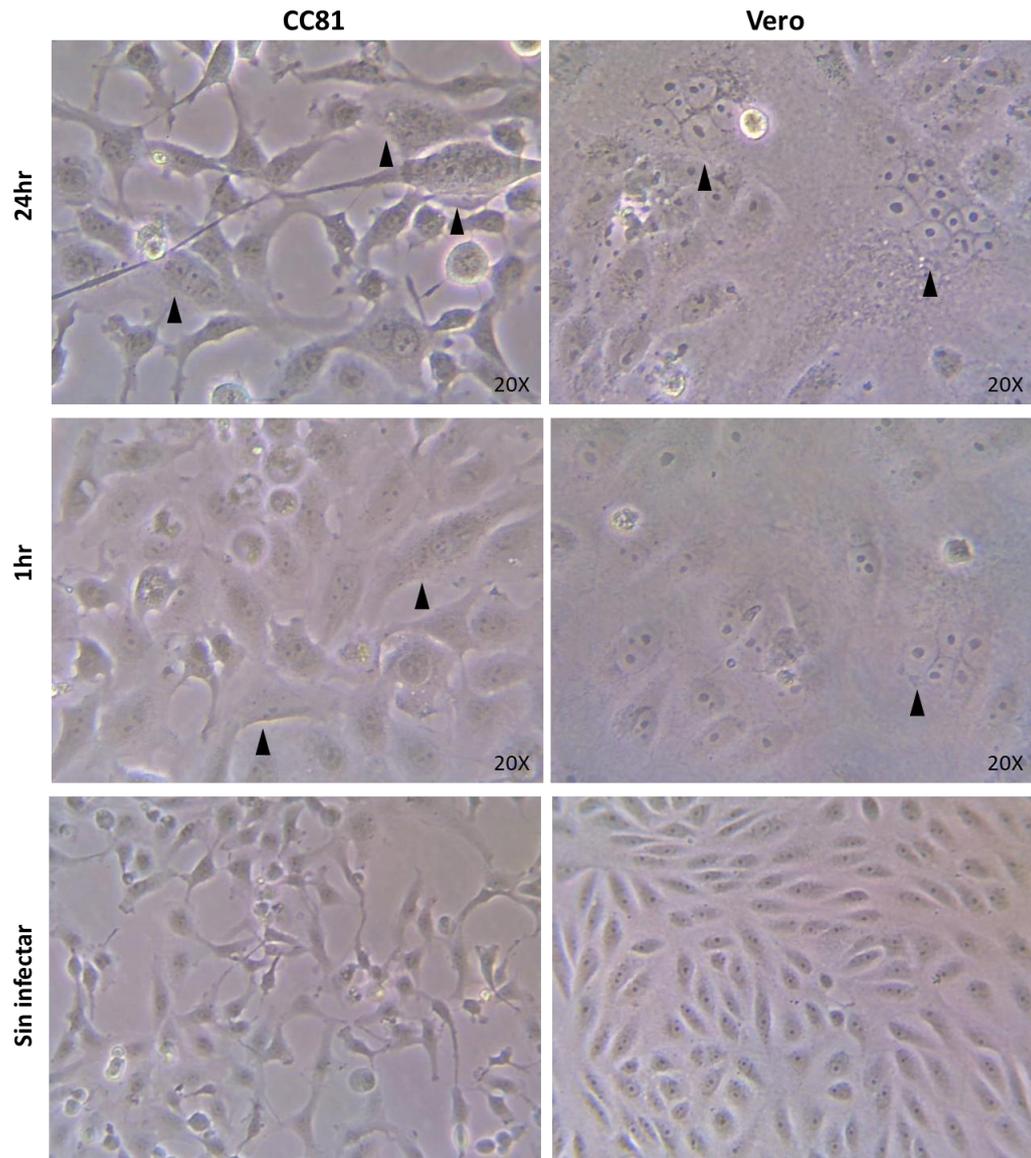


Figura 42. Infección de células Vero y CC81 con sobrenadantes de FLK.

Se muestran imágenes representativas de células Vero y CC81 infectadas con sobrenadantes derivados de las líneas celulares FLK persistentemente infectadas con VLB. En ambos casos se evaluó la infección dejando o retirando el inóculo viral. Como control se utilizaron células sin infectar. A las 24 hpi se tomaron imágenes con microscopio óptico. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ.

Tabla 4

Comparación del grado de formación de sincicios mediante la infección con sobrenadantes en distintos tiempos.

Grado de formación de sincicios*			
Línea celular		CC81	Vero
Sobrenadante	Tiempo de incubación		
FLK	1 hr	++	+
	24 hr	+++	++
BL3.1	1 hr	-	-
	24 hr	+	+

*Los resultados se expresan como el porcentaje aproximado de la monocapa que presenta sincicios (+: 1-10 %, ++: 10-30%, +++: mayor a 30%, - no se observan sincicios)

La “*Fusion from with in*”, es el resultado de la multiplicación del virus en la célula y de la presencia de la proteína Env en la membrana de la célula infectada. A través del contacto entre células, la proteína Env en la membrana de la célula reconoce al receptor presente en la otra célula, provocando la fusión y posterior formación de células multinucleadas.

La “*fusion from with out*” se describe como la formación de sincicios entre la célula donadora de factor de fusión (FLK) y la célula detectora (CC81, Vero). Las células FLK no son capaces de formar sincicios entre sí [209] y la razón se explica porque dicha línea celular si bien es productora de partículas virales, solo ofrece el factor de fusión en su membrana en este caso la proteína ENV y no posee el receptor.

En experimento de co-cultivo entre FLK y CC81 pudimos ver la formación de sincicios mediante ambos mecanismos. En la **Figura 43 A**, se puede ver un sincicio con 9 núcleos, donde observamos un núcleo de característica más alargado el cual se corresponde con el de FLK y nucleados a su alrededor núcleos más pequeños de forma redondeada que se corresponden a las células CC81 (“*fusion from with out*”). Dicho sincicio está formado por ambas células. Se puede ver también como una célula de CC81 se está fusionando al sincicio. Así mismo se puede ver en que los núcleos de FLK son de color menos intenso con respecto a los de CC81, lo cual nos habla también de la compactación de la cromatina. La fusión entre las células CC81 y FLK la observamos in vivo mediante un experimento de time lapse, en el cual durante 21 hrs se tomaron fotos cada 10 min, tomando 10 campos por pocillo (**AnexoII.Figura S 14**).

En otro experimento de co-cultivo, en donde los núcleos de cada tipo celular se tiñeron de un color diferente (CC81 azul y FLK blanco), se puede observar sincicios formados solo por la célula detectora en este caso CC81 (núcleos azules) “fusion from with in” (Figura 43 B). No se observan sincicios en las células CC81 cuando son cultivadas solas, lo cual indica que en presencia de FLK, las CC81 son capaces de ser infectadas y expresar la proteína Env, induciendo la formación de sincicios entre células CC81.

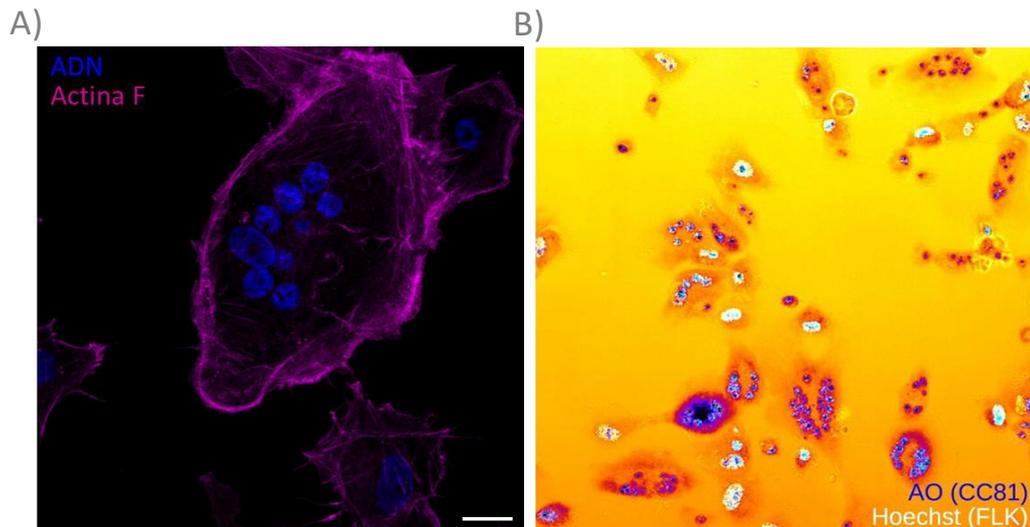


Figura 43. Fusión *from with in* y fusión *from with out*.

(A) Fusión *from with out*. Imagen de microscopía confocal en la cual se puede observar un sincicio formado entre células FLK y CC81, el cual contiene 9 núcleos. Se puede apreciar también una célula fusionándose. En magenta: el citoesqueleto de actina por tinción con faloidina, en azul: núcleos por tinción con verde de metilo. Barra 15 μm . (B) Fusión *from with in*. Imagen de microscopía confocal, donde se puede apreciar un sincicio formado por células CC81 con más de 10 núcleos. Los núcleos de las FLK se marcaron con H33342 (blanco) y los núcleos de CC81 se marcaron con AO (azul).

7.3.2 RETROTRANSCRIPCIÓN E INTEGRACIÓN DEL GENOMA DEL VLB AL GENOMA DE LAS CÉLULAS VERO O CC81.

La activación del LTR requiere de la expresión de la proteína Tax, y para que esto ocurra, el virus no solo debe entrar a la célula, sino que también debe retrotranscribirse, entrar al núcleo e integrarse al genoma de la célula hospedadora (CC81 o Vero). Luego de integrado en forma de provirus, si Tax se expresa, se unirá al LTR el cual guiará la expresión de la GFP. Por lo tanto, a la hora de seleccionar una línea celular es necesario evaluar si la misma es capaz de permitir la integración del virus.

Quisimos estudiar si ocurre la **retrotranscripción y posterior integración** en las líneas celulares CC81 y Vero infectadas. Para ello, realizamos la extracción del ADN genómico de células CC81 y Vero previamente

infectadas con sobrenadante de FLK o BL3.1. Se realizó una PCR para amplificar parcialmente gp51 y p24. Como el genoma de VLB es ARN doble, solo será posible amplificar dichos genes si el virus es retrotranscrito e integrado al genoma celular.

Como se puede ver en la **Figura 44** se pudo amplificar gp51 y p24 a partir de ADN genómico de ambas líneas celulares, infectadas con el sobrenadante de FLK (1hr y 7 dpi).

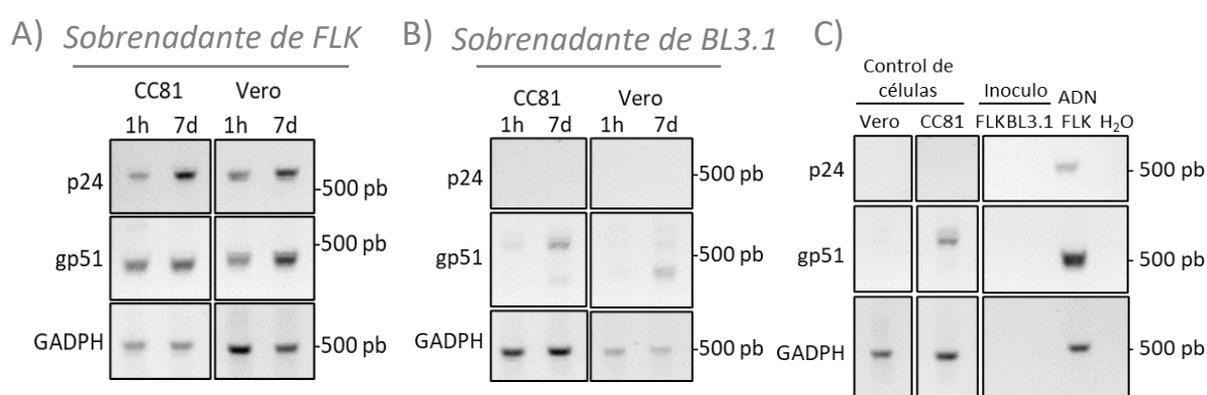


Figura 44. Integración del genoma de VLB en el genoma de células CC81 o Vero.

(A-C) A partir de células infectadas CC81 o Vero con sobrenadante de FLK o BL3.1, se realizó la extracción del ADN genómico y posteriormente se realizó una PCR para amplificar gp51 y p24. Como control de extracción se realizó la amplificación de GADPH. Como controles negativos se incluyeron: el inóculo viral y células sin infectar y como control de reactivos se utilizó H₂O. Cinco µL de cada producto de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y teñidos con bromuro de etidio. El tamaño esperado para gp51 es de 444 pb, para p24 es de 645 pb. (D) Esquema representativo del ciclo de multiplicación viral, en donde se recuadran las etapas de retrotranscripción e integración.

Sin embargo, a partir del ADN genómico de ambas líneas celulares infectadas con sobrenadante de BL3.1, p24 no se amplificó y gp51 se amplificó en aquellos cultivos en los que el inóculo no se retiró (**Figura 44 B**). Se observó, además, en el caso de la amplificación de gp51, una banda de mayor tamaño del esperado la cual también se observó en el control de células sin infectar. Para determinar a que corresponde esta banda de mayor tamaño, podríamos secuenciar la misma.

Para descartar que las bandas observadas correspondientes a gp51 y p24, se deban a una posible contaminación con células del inóculo viral derivado de FLK o BL3.1, el sobrenadante utilizado como inóculo viral se incluyó en la PCR como control. No se observó amplificación de ninguno de los dos genes en ninguno de los dos sobrenadantes empleados como inóculo.

Por otra parte, el control de extracción dio positivo en todos los casos se pudo amplificar GADPH, excepto en las muestras correspondientes a los sobrenadantes y el control de reactivos. Se incluyó como control positivo de la amplificación ADN genómico extraído de células de FLK (**Figura 44 C**).

A partir de este resultado podemos decir que cuando infectamos con sobrenadante de FLK las líneas celulares CC81 y Vero, el virus es capaz de retrotranscribirse e integrarse en ambas. No sucede lo mismo cuando utilizamos el sobrenadante de BL3.1. Esto podría deberse, como se mencionó previamente, a que esta línea celular es menos eficiente en la producción de partículas virales. Este resultado también concuerda con lo observado en la formación de sincicios.

7.3.3 LOCALIZACIÓN DE ENV Y GAG EN CÉLULAS VERO INFECTADAS

Luego de comprobar que en las líneas celulares CC81 y Vero las partículas virales de VLB de FLK son capaces de retrotranscribirse e integrarse en forma de provirus, analizamos si también existía expresión de proteínas. Condición necesaria para la generación del sistema reportero, ya que es necesaria la expresión de Tax.

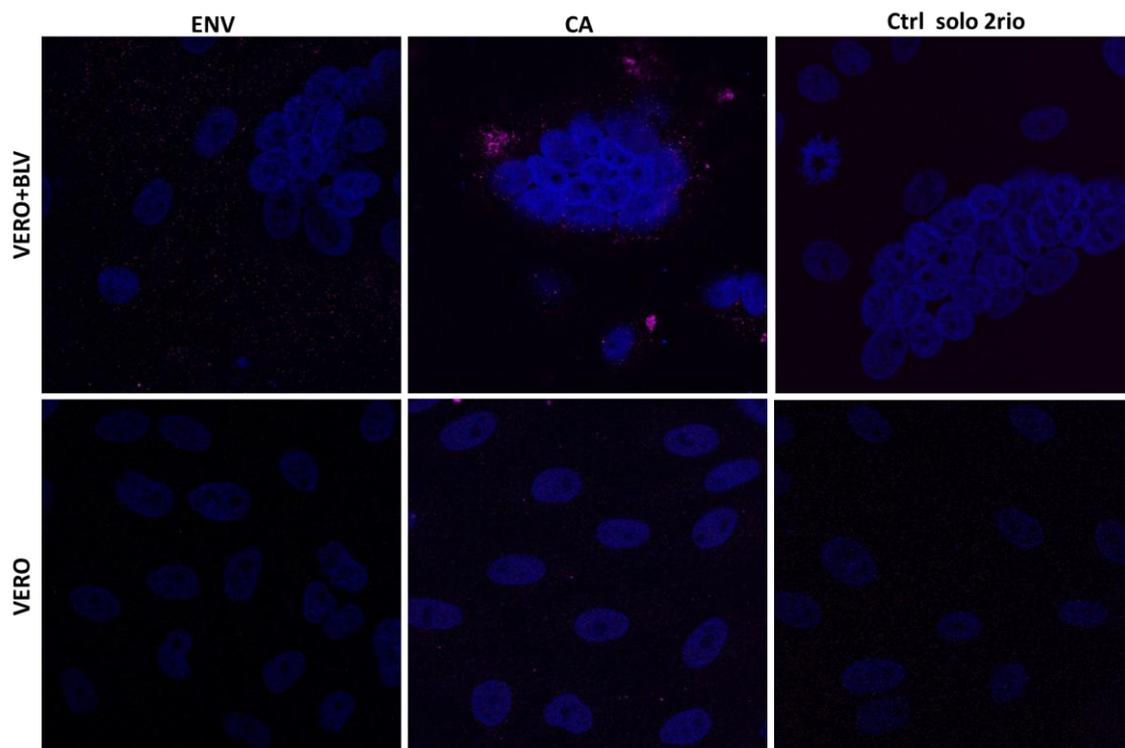


Figura 45. Localización de Env y Gag.

Células Vero fueron infectadas con sobrenadantes de FLK. A las 24 hrs pi, las células se fijaron con PFA 4%, y las proteínas intracelulares Env y CA se marcaron con los anticuerpos monoclonales VLB-1 (1/200) y VLB-3 (1/500), respectivamente y detectadas utilizando el anticuerpo anti mouse 594 (1/1000). Los núcleos se tiñeron con Hoescht 33342. Para la toma de imágenes se utilizó el microscopio confocal Leica, utilizando el objetivo 63X de inmersión en aceite, utilizando el láser 405 (Hoescht) y 594. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ. Como

control negativo se utilizaron células sin infectar. Como control del anticuerpo secundario, cultivos infectados y no infectados solo se les agregó el anticuerpo secundario para ver reconocimiento inespecífico.

Para ello células Vero fueron infectadas con sobrenadante de FLK y a las 24 hpi las células se fijaron y permeabilizaron. Se realizó una inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos monoclonales BLV-1 y BLV-3, que reconocen a gp51 y p24, respectivamente y se observó por microscopia confocal. Como se puede apreciar en la **Figura 45** se detectaron ambas proteínas, solo en aquellas células infectadas. Como las células se fijaron y se permeabilizaron, entendemos que ambas proteínas tienen una localización intracelular. Por otra parte, p24 se observó, con una localización citosólica peri nuclear esto es esperado ya que la partícula viral contiene aproximadamente 1500 Gag más que Env. Por otra parte, se observó la formación de sincicios, solo en el caso de las células infectadas. No se observó señal para ninguna de las dos proteínas en el control de células sin infectar, y tampoco hubo reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario (Ctrl solo secundario), lo cual nos confirma que la señal que observamos es específica de Env y p24. La **Tabla 5** resumen las interacciones del VLB con las líneas celulares CC81 y Vero.

Tabla 5

Resumen de las interacciones del VLB con las líneas celulares CC81 y Vero.

	Línea celular	
	CC81	Vero
Formación de sincicios		
Mediante Co-cultivo*		
FLK	+++	++
Mediante inoculación viral (cell free)**		
FLK	+++	++
BL3.1	+	+
Retrotranscripción/Integración		
FLK	Si	Si
BL3.1	No	No
Expresión de proteínas (Env y CA)		
Env	ND	Si
CA	ND	SI
Producción de progenie viral (pasajes en ciego)		
	ND	Si

* co-cultivo relación 1FLK:4CC81 o Vero

** tiempo de incubación 24 hrs

ND: no determinado.

Los resultados se expresan como el porcentaje aproximado de la monocapa que presenta sincicios (+: 1-10%, ++: 10-30%, +++: mayor a 30%, -: no se observan sincicios).

7.3.4 GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES REPORTERAS DE LA INFECCIÓN POR VLB

La generación de las líneas reporteras se realizó mediante la transducción de las líneas celulares CC81 y Vero, con los PVs generados, LTRBLVGFP (**Figura 46 A**).

Como se puede apreciar en la **Figura 46 B**, para el caso de las células Vero y CC81, transducidas con PVs LTRVLBGFP no se detectó la expresión de GFP. Este resultado es el esperado ya que el promotor LTR, tiene una actividad basal muy baja y solo en presencia de Tax o frente a la infección con VLB es capaz de activarse e inducir la expresión de GFP. Como control positivo se realizó la transducción de las células FLK. Las células FLK, infectadas persistentemente con VLB, entre otras cosas producen la proteína transactivadora del LTR de VLB, Tax. Por lo tanto, el hecho de observar GFP en dicha línea, nos permite decir que tanto las construcciones como la producción de PVs fueron correctas.

Por otro lado, las tres líneas celulares se transdujeron con los PVs CMVGFP (control). En los tres casos se observó la expresión de GFP. Este resultado era el esperado, dado que estos PVs al contener el promotor

constitutivo de CMV tienen capacidad de inducir altos niveles de expresión del transgen en este caso GFP. A su vez, a partir de este control podemos ver cuán eficiente es el proceso de transducción en las tres líneas celulares. Como se puede apreciar en la **Figura 46 B**, hay un menor número de células GFP positivas en Vero en comparación con lo observado en CC81 y FLK (se sembró la misma cantidad de células para cada una). Estos PVs contienen en la membrana la proteína G de VSV, de características pleiotrópicas, por lo que tiene la capacidad de fusionarse y entrar a múltiples líneas celulares, sin embargo, las células Vero parece ser más restrictivas que las CC81 y las FLK. A partir de estos resultados, continuamos con la amplificación de las líneas reporteras generadas para realizar los siguientes ensayos además de amplificar para hacernos un stock de bajos pasajes. A las líneas celulares reporteras las llamamos: CC81LTRVLB y VerolTRVLB.

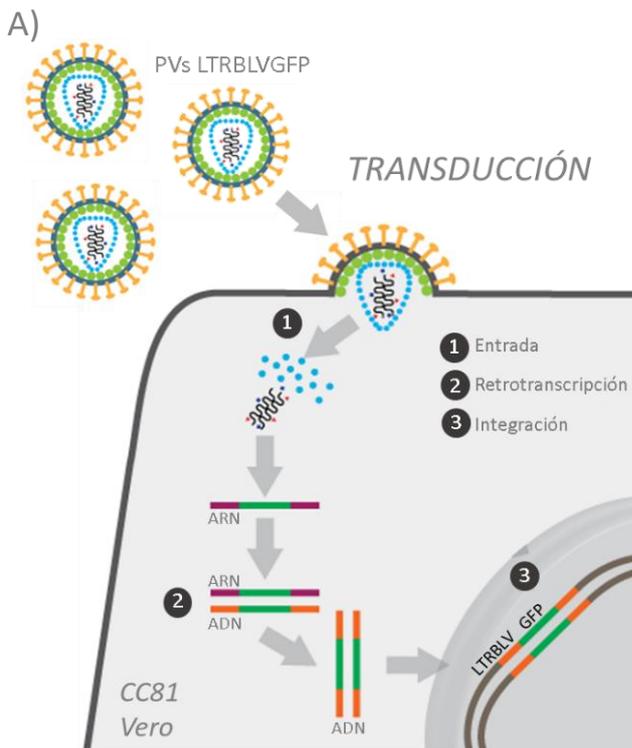
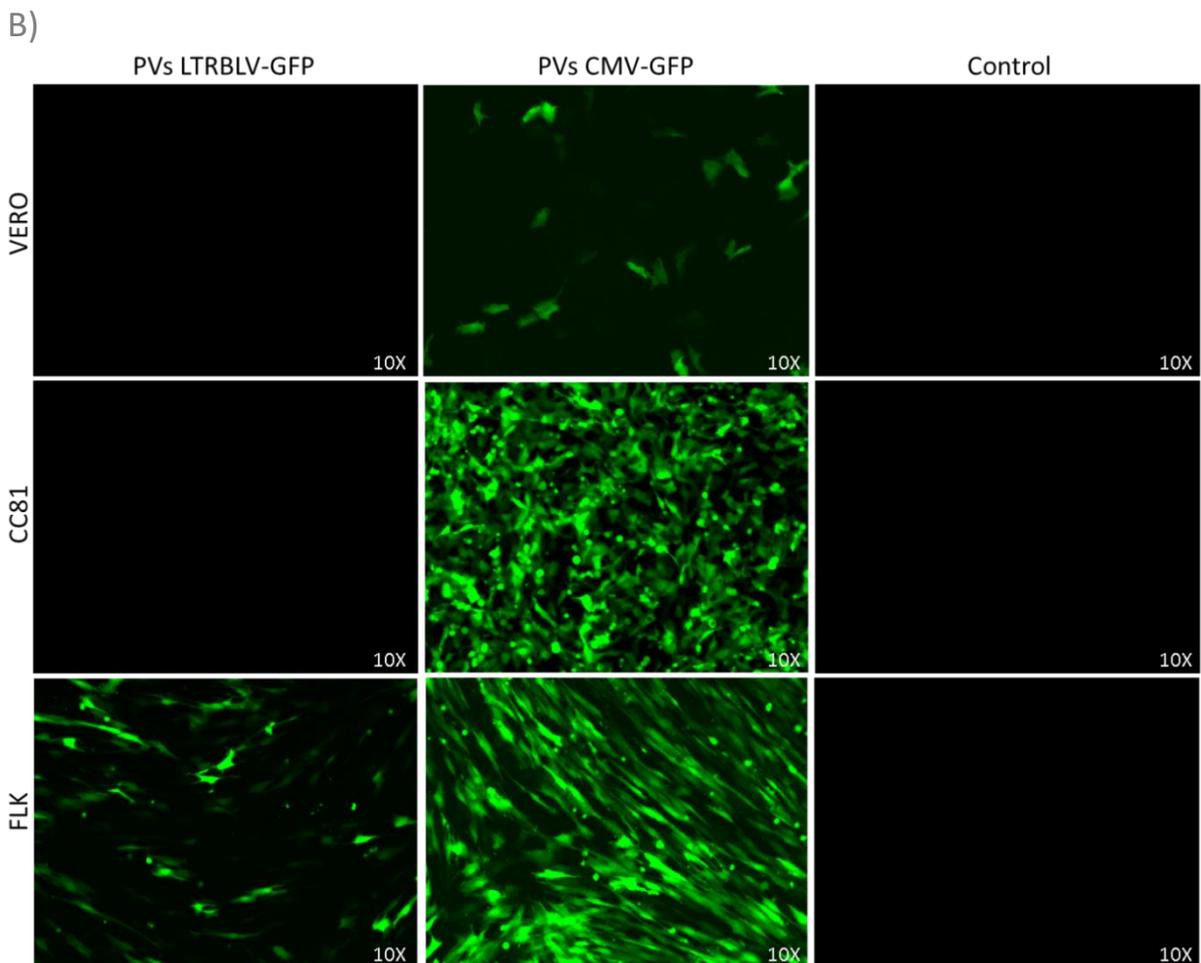


Figura 46. Generación de líneas reporteras.

(A) Esquema representativo del proceso de transducción de las células CC81 y Vero. (B) Se realizó la transducción de las líneas celulares con 250 μ L de PVs (LTRVLBGFP o CMVGFP) diluidos al medio en medio de cultivo y 10 μ L de polibreno 250 μ g/mL. Se incubó durante 60 hrs y se observó al microscopio de epifluorescencia. Como control positivo de transducción se incluyó la línea celular FLK y como control negativo cada una de las líneas celulares sin transducir. Las imágenes se analizaron en Image J



7.3.5 CO-CULTIVO DE LAS LÍNEAS REPORTERAS CON LA LÍNEA FLK

El siguiente paso fue co-cultivar las líneas reporteras con la línea FLK, para evaluar si las mismas podían usarse para medir la infección por VLB. Para ello, se co cultivaron las FLK:línea reportera en una relación 1:1. La expresión de GFP se evaluó a las 24 y 48 hrs, mediante microscopio de epifluorescencia. A las 24 hrs solo se detectaron sincicios fluorescentes entre las células FLK y la línea CC81LTRVLB, mientras que a las 48 hrs, se observaron en ambos co-cultivos. Los sincicios fluorescentes con CC81LTRVLB fueron más evidentes, sin embargo en el co-cultivo FLK:VerolTRVLB, apenas pocas células fueron GFP positivas (**Figura 47 B**). Posteriormente evaluamos co-cultivar a distintas relaciones de FLK:reportera (1:1, 1:2 y 1:4) y a las 48 hrs medimos el porcentaje de GFP por citometría de flujo. Por citometría, para el caso del co-cultivo entre FLK y CC81LTRVLB, pudimos ver que el porcentaje de GFP, aumentaba conforme aumenta la proporción de la línea reportera respecto a FLK **Figura 48 A**. El mismo comportamiento se observó para el co-cultivo entre FLK y VerolTRVLB **Figura 48 B**. Esto se explica porque al poner más células que tiene el gen reportero, 1FLK por cada 4 de reportero, más GFP podría expresarse. Asimismo pudimos observar que con la línea reportera CC81LTRVLB, hay mayor porcentaje de células GFP positivas respecto a las VerolTRVLB.

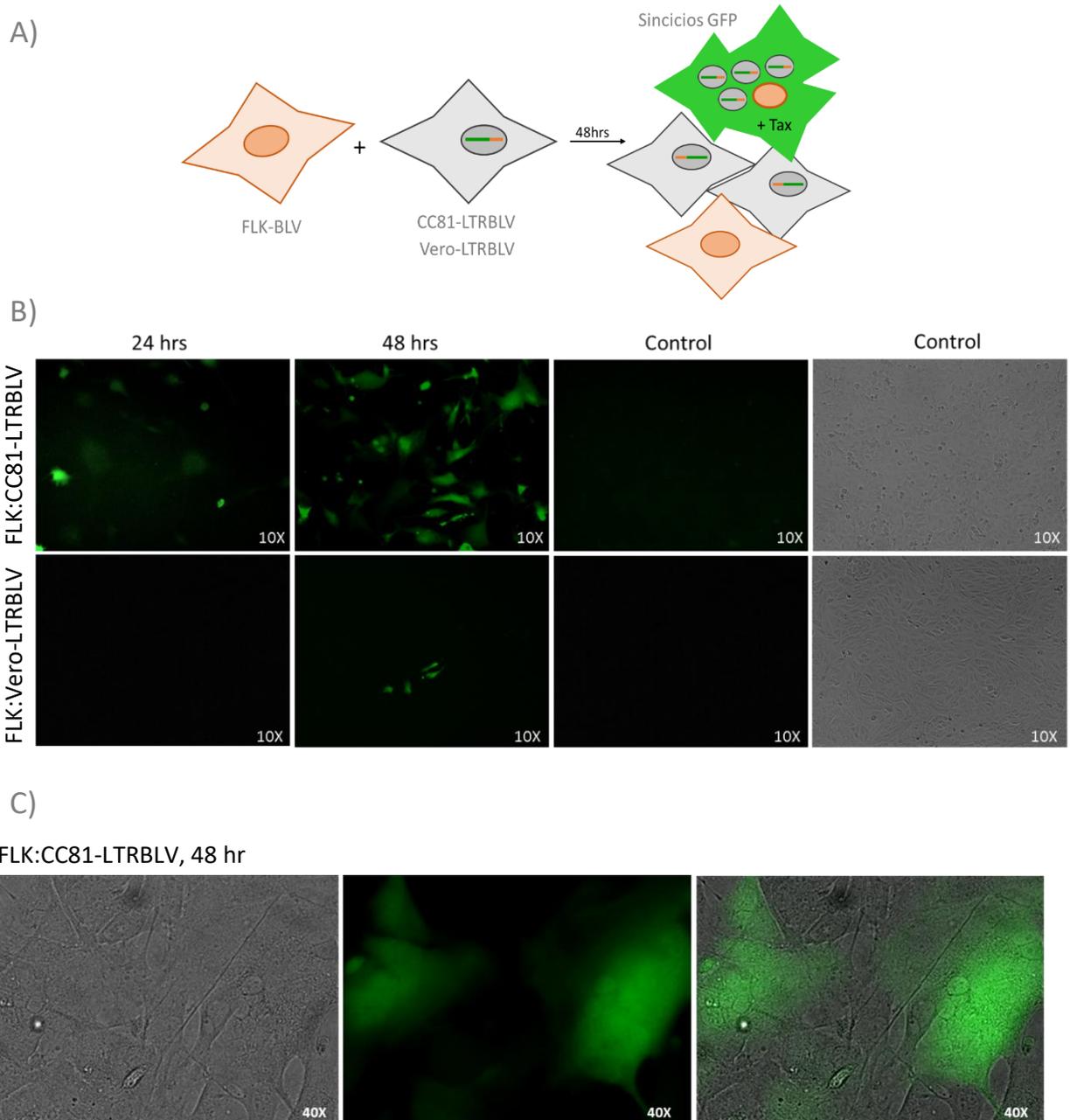


Figura 47. Co-cultivo de las líneas reporteras con la línea FLK.

(A) Representación esquemática da el co-cultivo entre la línea FLK y las líneas reporteras Vero-LTRBLV y CC81-LTRBLV y la formación de sincios GFP positivos. (B) Imágenes representativas del co-cultivo entre FLK y cada una de las líneas reporteras, a las 24 y 48 hrs post co-cultivo. (C) Imagen con aumento 40X de un sincicio formado entre la línea celular FLK y la línea reportera CC81-LTRBLV. Imágenes tomadas en microscopio de epifluorescencia.

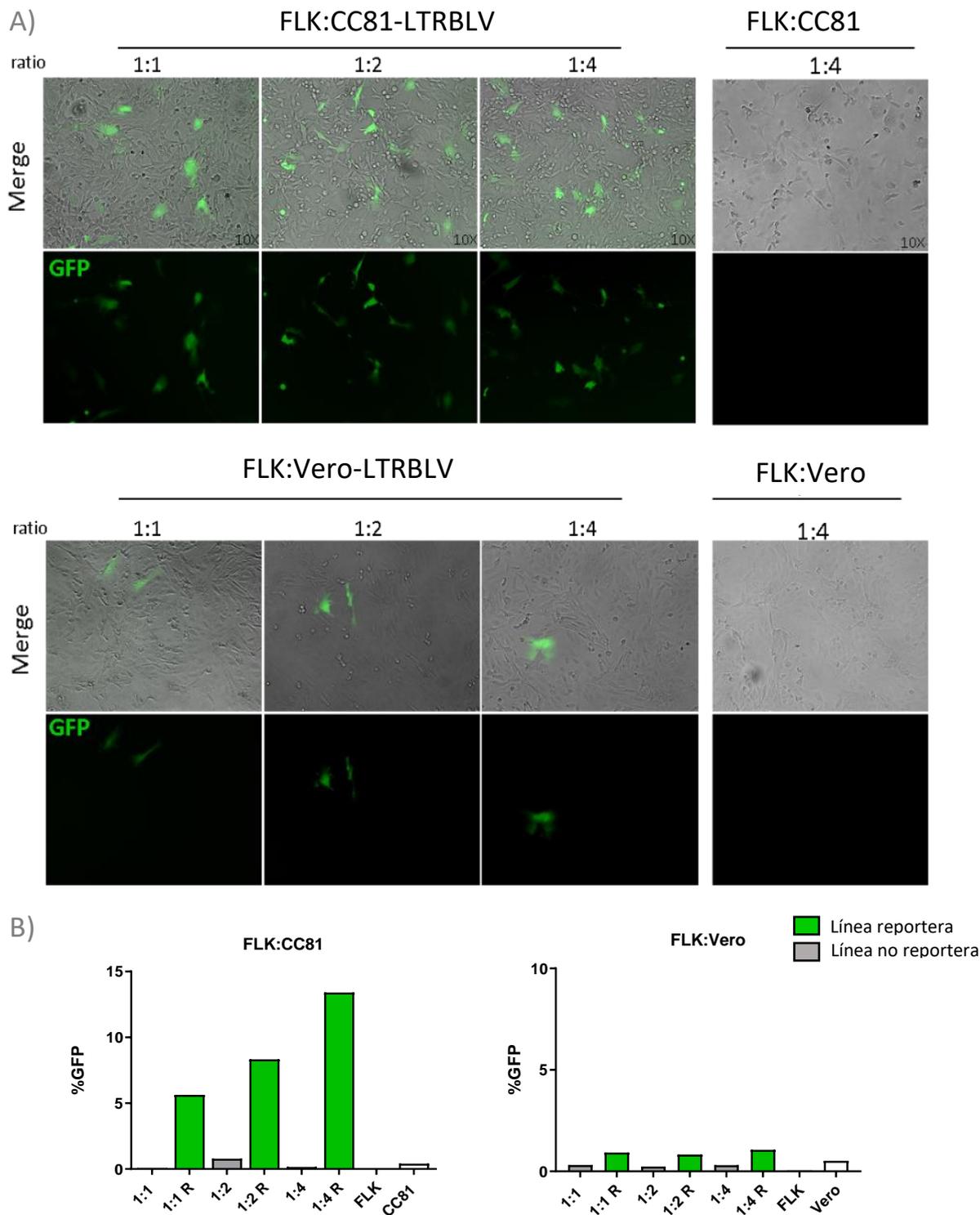


Figura 48. Optimización de la relación de co-cultivo entre FLK y las líneas reporteras.

(A) Se realizó el co-cultivo entre la línea celular FLK y cada una de las reporteras en las relaciones 1:1, 1:2 y 1:4 (FLK:reportera). A las 48 hrs post co-cultivo se tomaron imágenes en el microscopio de epifluorescencia. **(B)** Las células se fijaron con PFA % y se analizaron por citometría de flujo. Se representa el porcentaje de células GFP% (verdes) obtenidas en cada relación de co-cultivo. Se incluyó en el análisis el co-cultivo de las FLK con cada una de las líneas no reporteras (gris).

Las dos líneas reporteras generadas CC81LTRVLB y VerolTRVLB, expresaron GFP y formaron sincicios, cuando se co-cultivaron con FLK. La línea reportera CC81LTRVLB, mostró tener un rápido crecimiento y una mejor respuesta a la infección por VLB en comparación con la VerolTRVLB, la cual mostró ser menos sensible a la infección. En la **Tabla 6** se puede ver un resumen de los resultados para cada una de las líneas reporteras generadas. Por otro lado, la formación de sincicios GFP positivos, dependen de la relación entre las células FLK y la línea reportera, el mismo resultado se observó en el ensayo de puesta a punto de la formación de sincicios.

Tabla 6

Resumen de las líneas reporteras de la infección por VLB.

	Línea reportera generada *	
	CC81LTRVLB	VerolTRVLB
Formación de sincicios		
Co-cultivo con FLK	+++	+
Expresión de GFP		
24 hrs	++	-
48 hrs	+++	++

Los resultados se expresan como el porcentaje aproximado de la monocapa que presenta sincicios (+: 1-10%, ++: 10-30%, +++: mayor a 30%, -: no se observan sincicios).

Los resultados obtenidos hasta el momento son muy alentadores, sin embargo, son necesarios experimentos en los cuales comparemos el ensayo de formación de sincicios convencional con el sistema reportero desarrollado, mediante el conteo de sincicios, y que nos permitan determinar la correlación, si es que existe entre ambos métodos de detección de infección por VLB. Por otro lado también, experimentos de co-cultivo con PBMC de vacas, para evaluar su uso en la determinación de muestras positivas y correlacionarlo con la medida de la carga viral.

Aspectos relacionados a la secuencia del LTR podrían ser evaluados y/o incorporados en nuestro sistema. La regulación de la replicación del VLB mediada por la proteína Tax es inducida mediante su interacción con la región U3 presente en el 5´LTR. La región U5 contiene un sitio de unión a un factor de regulación del interferón, que induce de manera independiente la replicación del VLB [255]. Sato et al., desarrollaron el sistema reportero LuSIA, mediante la transfección de manera estable de células CC81 con un plásmido conteniendo la región U3 del 5´LTR de VLB [248]. Luego en un siguiente trabajo, optimizaron su sistema reportero mediante la introducción de mutaciones en el sitio de respuesta a glucocorticoides (GRE). Los resultados mostraron que estas mutaciones aumentaban la sensibilidad del sistema reportero [249].

Contar con un sistema reportero tiene la ventaja de ser más sensible y de más fácil medida, nos permite el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras, con el objetivo principal de medir la

capacidad infectiva del virus en muestras biológicas, tales como, muestras de sangre y calostro. Así mismo, también permitirá evaluar la efectividad de métodos de inactivación viral (calor, UV, detergentes) y procesos de inactivación y esterilización de calostros (congelado, pasteurización y secado). También podría ser de gran utilidad para evaluar la capacidad neutralizantes de anticuerpos, por ejemplo, generados frente a un inmunógeno.

Uno de los desafíos al momento del diseño de un nuevo inmunógeno es que sea capaz de inducir anticuerpos neutralizantes. Los ensayos de neutralización *in vivo* son una herramienta imprescindible para evaluar la respuesta inmune generada frente una vacuna además de ser útil en el screening de nuevos inmunógenos.

8 CONCLUSIONES POR OBJETIVO ESPECÍFICO

1- Producir y caracterizar mediante técnicas biofísicas, bioquímicas e inmunológicas “*Virus Like Particles*” de VLB.

Uno de los objetivos centrales de nuestro trabajo de tesis fue producir “*Virus like particles*” (VLPs) de VLB utilizando un sistema de expresión eucariota basado en células S2 de *Drosophila melanogaster*. Mediante la co-transfección de la línea celular S2 con los plásmidos específicos, logramos generar dos líneas celulares estables: **Gag/Envwt-S2** y **Gag/EnvFm-S2**. La co-expresión de las proteínas Gag, Envwt y EnvFm se confirmó mediante western blot, inmunofluorescencia y su antigenicidad fue evidenciada mediante el uso de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer epítopes lineales y conformacionales específicos presentes en las proteínas Env y Gag. Por otro lado, la expresión e incorporación de la proteína EnvFm en la membrana de las células transfectadas fue evidenciada por citometría de flujo. Asimismo, también logramos determinar que la mutación del sitio de procesamiento proteolítico en la proteína EnvFm no alteró drásticamente ni la expresión ni su entrada en la vía secretoria de las S2. El hecho de que el anticuerpo monoclonal BLV-1 reconozca EnvFm, sugiere que la misma retiene importantes motivos estructurales cuando es expresada en células S2.

En cuanto a las VLPs purificadas, pudimos determinar que la Envwt presente en las VLP1 es procesada correctamente por proteasas celulares tipo furina, como era esperado. Para el caso de las VLP2, determinamos que la proteína EnvFm no es clivada por la furina quedando unidos gp51 y gp30 en forma covalente. Las Envs expresadas en las VLP1 y VLP2 se encuentran glicosiladas, y pudimos identificar mediante espectrometría de masa la presencia de dos residuos paucimanosídicos unidos al aminoácido N203. Las VLP2, con su Env mutada en el sitio furina, presentarían en su superficie una glicoproteína Env en un estado conformacional de tipo pre-fusión. Por microscopía electrónica de transmisión (MET) logramos visualizar estructuras con forma y tamaño similares a VLPs brotando de las células transfectadas. Asimismo también pudimos demostrar por MET la presencia de vesículas esféricas no agregadas y de tamaño variable similares a las descritas previamente para VLPs de otros retrovirus. La naturaleza polidispersa y no agregada de estas partículas extracelulares purificadas a partir de los sobrenadantes de cultivo fue confirmada por dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS)

En suma, logramos producir, purificar y caracterizar VLPs que expresan las dos proteínas más inmunogénicas de VLB: Gag y Env. Estas VLPs carecen de las proteínas reguladoras y principalmente no contienen el genoma viral, por lo que las mismas representan estructuras supramacromoleculares no infecciosas. Estas VLPs podrían constituir una plataforma para la construcción de vacunas contra el VLB,

por lo cual resulta necesario realizar estudios *in vivo* para evaluar su inmunogenicidad y la respuesta humoral y celular generada frente a las mismas.

2- Analizar las propiedades inmunogénicas e inmunosupresoras del ectodominio de la proteína Env de VLB y un mutante en el dominio de inmunosupresión en un modelo murino.

Para llevar a cabo este objetivo, lo primero fue la expresión y caracterización de las proteínas Env WT y MUT. La expresión de ambas proteínas se logró con éxito, obteniéndose muy buenos rendimientos de proteína purificada por litro de cultivo (aprox. 10 mg/L). Desde el punto de vista de la estructura oligomérica, en ambos casos presentaron al menos 3 estados: monómero, dímero y estructuras oligoméricas de mayor peso molecular que el trímero. Con respecto a la expresión de la proteína Env MUT el monómero parecería ser estable y permanecería inalterado, no ocurriendo un desplazamiento del equilibrio a la especie trimérica. Asimismo, ambas proteínas resultaron ser antigénicas. Estos resultados nos dieron una idea de que las mutaciones introducidas en ISU, no parecían alterar la conformación de la proteína. El eje central de este objetivo específico era comparar la capacidad inmunogénica e inmunosupresora entre ambas proteínas en un modelo murino. Respecto a la respuesta inmune humoral analizamos el título de anticuerpos IgG totales específicos anti-Env y su capacidad neutralizante mediante la inhibición de formación de sincicios. Pudimos determinar que ambas proteínas fueron inmunogénicas, generando una importante producción de anticuerpos específicos determinados por ELISA en sueros de ratones inmunizados. Sin embargo, la proteína WT generó un título mayor de anticuerpos respecto a la proteína MUT, lo cual constituye para nosotros un resultado no-esperado, ya que anticipábamos que la mutación del dominio de inmunosupresión podría generar una respuesta aumentada frente a la proteína MUT al compararse con la WT. Una posible explicación a este resultado no-esperado podría basarse en el modelo animal utilizado. Los dominios de inmunosupresión utilizados por los retrovirus podrían tener propiedades inmunosupresoras específicamente en las especies susceptibles a la infección. Para probar esta hipótesis resulta imprescindible analizar la respuesta inmune humoral en un modelo bovino. Por otro lado, para poder cuantificar la actividad neutralizante de los anticuerpos específicos anti-Env, logramos poner a punto una metodología basada en la medida de la inhibición de la formación de sincicios. Utilizando esta técnica demostramos actividad neutralizante en sueros bovinos positivos para VLB al compararlos con los sueros bovinos negativos. Analizamos también los sueros hiperinmunes obtenidos a partir de los grupos de ratones inmunizados con la glicoproteína Env WT y la que tiene el ISU mutado. Los sueros de los animales inmunizados tanto con WT como con ISU generaron una respuesta inmune humoral con actividad neutralizante medida por inhibición de la formación de sincicios. Sin embargo, también observamos una fuerte actividad neutralizante en el suero pre-inmune y en un suero control negativo de un ratón BALB/c. Este resultado inesperado, podría deberse a la presencia en el modelo murino de anticuerpos polireactivos de tipo IgM con actividad neutralizante natural frente al VLB. En el

modelo murino no ha sido descrita la infección natural con VLB, lo cual podría ser explicado por la existencia de un conjunto de mecanismos naturales de resistencia a la infección, donde los anticuerpos naturales polireactivos podrían jugar un rol importante. Serán necesarios más ensayos para poder encontrar una respuesta a este resultado.

En relación a la respuesta inmune celular generada frente a Env WT y MUT, no se lograron demostrar diferencias estadísticamente significativas en la proliferación de células T CD4+ y CD8+ en aquellos esplenocitos derivados de ratones inmunizados con WT y MUT. Sin embargo, en el caso de las células T CD8+, pudo observarse una clara tendencia a la proliferación en aquellos esplenocitos derivados de la inmunización con la Env WT en comparación con la proliferación relacionada a la inmunización con la Env MUT. Por otro lado, el análisis de la expresión de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados *in vitro* con Env WT mostró de manera general un aumento de la expresión en los animales inmunizados con Env WT respecto a Env MUT. En particular pudo observarse un aumento significativo en la producción IL17-A por aquellos esplenocitos derivados de la inmunización con Env WT respecto a los esplenocitos derivados de los ratones inmunizados con la proteína Env MUT. Este aumento de la respuesta de tipo Th17 frente a la glicoproteína Env nos está indicando la activación de esta rama celular de la respuesta inmune adaptativa. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en el análisis de la respuesta inmune adaptativa humoral, encontrando una respuesta aumentada cuando comparamos los ratones inmunizados con Env WT en comparación con Env MUT en el dominio ISU. Por otro lado, estos resultados obtenidos en un modelo murino no nos permiten concluir sobre el efecto que tendría la mutación en el dominio ISU sobre la respuesta inmune desarrollada por inmunización en un modelo bovino.

En suma, demostramos que el ectodominio de la glicoproteína Env de VLB en su forma nativa (WT) como mutada (MUT) en el dominio de inmunosupresión (ISU) son inmunogénicas en un modelo murino, generando una respuesta inmune adaptativa tanto de la rama humoral como celular. Las diferencias de respuestas inmunológicas encontradas entre ambas formas permitirían sugerir que el dominio ISU de VLB podría jugar un rol en la modulación de dichas respuestas. Para poder concluir sobre este punto se deberían repetir estos experimentos en un modelo bovino.

3- Generar un sistema reportero para la infección por VLB.

Por último, otro de nuestros objetivos fue generar nuevas herramientas que nos permitieran determinar la capacidad infectiva por VLB presente en diferentes muestras biológicas. Inicialmente logramos poner a punto un ensayo para la determinación de la infección celular mediante la observación por microscopía de la formación de sincicios. Encontramos que el co-cultivo entre las líneas celulares CC81 o Vero junto a la línea FLK persistentemente infectada con VLB, permitía determinar la formación de sincicios como

parámetro observable de la infección viral. También demostramos que las líneas celulares CC81 y Vero también formaban sincicios cuando utilizamos como inóculo sobrenadante conteniendo partículas virales sin necesidad de realizar co-cultivo con la línea FLK. La comparación de los sincicios formados por las líneas CC81 y Vero, mostró que la línea CC81 era capaz de formar mayor cantidad de sincicios y de mayor tamaño (mayor número de núcleos). Por otro lado, pudimos determinar por PCR que utilizando como inóculo sobrenadante conteniendo partículas virales, las mismas se retrotranscriben e integran en forma de provirus al genoma de las líneas CC81 y Vero. El ensayo de formación de sincicios es muy robusto para el análisis de infectividad viral, pero tiene como problema técnico principal la complejidad del recuento de los sincicios que tiene que realizarse de manera visual. Por ello, en la parte final de nuestro trabajo de tesis nos planteamos como alternativa tecnológica, la generación de un sistema reportero para la infección de VLB. Mediante el uso de pseudovirus lentivirales de segunda generación, logramos construir dos líneas celulares reporteras: CC81-LTRVLB y Vero-LTRVLB. Ambas líneas celulares estables tienen integrado en su genoma un constructo que contiene el promotor viral LTR-VLB asociado a la región codificante de la proteína fluorescente GFP. El promotor LTR-VLB se activa en presencia de la proteína viral Tax (activador transcripcional) la cual solo está presente cuando se produce la infección viral de la línea reportera. Logramos demostrar que el cultivo de las líneas celulares reporteras solas no expresan GFP, en tanto el co-cultivo de las mismas con la línea FLK persistentemente infectada con VLB genera una fuerte expresión de GFP. Tanto por microscopía como por citometría de flujo observamos un mayor número de células GFP en la línea reportera derivada de CC81, respecto a las Vero. Inclusive a las 24 hrs ya observamos señal en CC81 mientras que en Vero recién a las 48 hrs. Estos resultados preliminares, y que tienen que ser aún optimizados para poder obtener información cuantitativa, son muy promisorios ya que generan una nueva herramienta que podría ser aplicada en diferentes ensayos de screening, incluyendo: 1)- la evaluación de la capacidad neutralizante de anticuerpos de múltiples muestras a la vez; 2)- medir la capacidad infectiva de diferentes muestras biológicas como sangre, fluidos mucosos, semen, calostro, leche; 3)- analizar el impacto de la aplicación de diferentes procesos de inactivación sobre la infectividad viral (congelado, pasteurización, uso de desinfectantes, etc.); así como también 4)- la evaluación de compuestos con capacidad anti-viral.

Por último, quiero destacar que contar con el ensayo de formación de sincicios y con un sistema reportero es de gran utilidad para nuestro laboratorio, ya que los mismos podrían ser empleados en el abordaje de las distintas líneas de investigación, desde el estudio de la respuesta inmune, estudios estructurales y/o funcionales.

9 CONCLUSION FINAL

- Este trabajo se enmarca en una de las principales líneas de investigación de nuestro laboratorio que es el desarrollo de inmunógenos contra el VLB.
- A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, intentamos contribuir al conocimiento en el desarrollo de una vacuna contra el VLB, mediante la generación de distintos inmunógenos. Por primera vez, y utilizando el sistema de expresión de células S2 de *Drosophila*, generamos VLPs de VLB formadas por las dos proteínas más inmunogénicas de VLB, Env y Gag. Estas VLPs diseñadas racionalmente podrían ser un inmunógeno adecuado para ser utilizado: i) en la caracterización la respuesta inmune generada por este virus; y ii) para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, estudios *in vivo* en bovinos son necesarios para evaluar su inmunogenicidad.
- Expresamos y caracterizamos el ectodominio de la glicoproteína Env wt y con mutaciones en el ISU. Ambas proteínas fueron inmunogénicas en el modelo murino, sin embargo, para un análisis exhaustivo de la respuesta inmune humoral y celular, deberán ser evaluados en el modelo bovino.
- Generamos un sistema reportero que permitirá medir capacidad infectiva de muestras biológicas y procesos de inactivación de estas, así como también evaluación de compuestos con capacidad anti-viral.
- En las condiciones epidemiológicas de nuestro país, con una prevalencia que supera el 70% del ganado lechero infectado, la estrategia de control asociada a detección y eliminación de animales positivos para VLB, es desde el punto de vista económico difícil de implementar. Los inmunógenos generados en esta tesis podrían ser de gran utilidad para disminuir la transmisión viral desde el ganado infectado al no infectado. El uso de alguna de estas herramientas integradas junto a otros procedimientos como el mejoramiento de las prácticas veterinarias para evitar la transmisión de células infectadas, el control de insectos hematófagos, la pasteurización de calostro, etc., podría lograr una disminución de la transmisión viral y un descenso de la prevalencia global. Con una baja prevalencia, la metodología utilizada por los países europeos de separar los animales positivos de los negativos, y la eliminación preferencial de los primeros podría ser utilizada en nuestro país.

10 PERSPECTIVAS

Los principales resultados obtenidos en este trabajo de tesis permiten plantear un conjunto de perspectivas de desarrollo científico-tecnológico que le den continuidad al mismo. A continuación, describimos en forma resumida algunas de las actividades planteadas como perspectivas futuras de este trabajo.

1)- Ensayos preliminares de inmunización en bovinos.

En este trabajo logramos producir diferentes formatos de VLPs, y de formas solubles del ectodominio de Env de VLB utilizando un sistema de expresión eucariota (*D. melanogaster*). Por otro lado, disponemos también en nuestro laboratorio la capacidad de expresar la proteína p24 (cápside de VLB) en grandes cantidades y en forma pura, utilizando un sistema de expresión procariota (*E. coli*).

Como perspectiva inmediata proponemos realizar un conjunto de ensayos controlados de inmunización utilizando un modelo bovino. En el mismo se ensayarán los diferentes inmunógenos disponibles en nuestro laboratorio.

En los primeros ensayos buscaremos determinar: a)- la concentraciones óptimas para cada uno de los inmunógenos a utilizar, b)- la vía de inoculación, c)- el tipo de adyuvante que usaremos para potenciar una respuesta inmune efectiva, d)- el número y el período de separación entre las diferentes dosis a administrar, e)- la aparición de efectos adversos asociados a la vacunación. Un conjunto de variables importantes a cuantificar en estos experimentos iniciales se obtendrán mediante el uso de análisis de inmunogenicidad.

Desde el punto de vista de la respuesta humoral, se realizará un análisis de la cinética de los niveles de anticuerpos específicos anti-VLB. Para ello disponemos de kits de ELISA nacionales generados a partir de trabajos previos de nuestro laboratorio articulando con otras instituciones académicas y empresas, que nos permiten determinar tanto en suero como en leche la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra el ecto-dominio de Env de VLB como contra la proteína de cápside p24. Se analizarán también mediante ELISA los diferentes isotipos de inmunoglobulinas generados. Asimismo, desde el punto de vista funcional se analizará la actividad neutralizante de dichos anticuerpos mediante utilización de las metodologías desarrolladas en esta tesis (inhibición de la formación de sincicios y utilización de la línea celular estable reportera de infección).

Desde el punto de vista de la respuesta inmune celular se analizarán a partir de obtención de muestras del ganglio drenante y de PBMC las características funcionales de las diferentes subpoblaciones

linfocitarias en respuesta a los diferentes antígenos, analizando en particular la secreción de diferentes perfiles de citoquinas.

Estos ensayos preliminares se realizarán en el marco de la Unidad Mixta Pasteur – INIA, donde contamos entre ambas instituciones con el conjunto de infraestructuras, equipamientos y recursos humanos capacitados en los diferentes componentes del proyecto.

Los resultados de estos ensayos preliminares en bovinos deberían permitirnos pasar a ensayos de vacunación controlados con el objetivo de determinar la eficacia de la inmunización en condiciones de campo y poder evaluar el impacto de la vacuna para reducir la infección por VLB en el grupo vacunado comparado con el grupo no-vacunado. De acuerdo al tipo de inmunógenos que se utilice, disponemos en nuestro laboratorio de metodologías que nos permiten diferenciar entre animales inmunizados y vacunados (DIVA), utilizando metodologías serológicas o moleculares.

2)- Optimizar la inmunogenicidad de los antígenos generados mediante ingeniería genética.

Los resultados que se esperan obtener de las pruebas preliminares en bovinos, también nos darán insumos importantes a los efectos de planificar ciertas modificaciones a introducir en los antígenos utilizados, así como al uso de adyuvantes diferentes para poder generar preparados más potentes.

Tenemos muy claro que el desafío de generar vacunas efectivas contra retrovirus es muy complejo, teniendo como modelos y ejemplo de estudio las diferentes estrategias desarrolladas para obtener vacunas eficientes contra HIV y contra HTLV.

Uno de los aspectos actualmente más estudiados para el desarrollo de vacunas eficientes contra retrovirus se basa en la estabilización de estructuras tridimensionales de las proteínas Env que sean estables y que correspondan a las conformaciones en estado de pre-fusión. Para ello es necesario introducir modificaciones puntuales en dichas proteínas a los efectos de fijar dichas conformaciones preferenciales. Para el caso de Env de VLB no disponemos de información tridimensional a partir de estructuras cristalográficas resueltas por lo cual un análisis *in silico* a partir de nuevos desarrollos de software (AlphaFold, [195]) basados en inteligencia artificial y de la gran cantidad de información estructural ya acumulada en las bases de datos públicas, podría ser de gran ayuda para introducir modificaciones aminoacídicas en forma racional a los efectos de lograr estabilizar estas estructura tipo pre-fusión.

Asimismo, en el modelo HIV resultó muy importante lograr la estabilización de la forma trimérica soluble de la glicoproteína Env, usando en algunos casos la introducción de dominios específicos de trimerización (foldon).

Otro posible punto de intervención en las estructuras de los antígenos refiere al impacto sobre la inmunogenicidad de los componentes glucídicos, los cuales pueden ser modificados mediante introducción de mutaciones puntuales de aminoácidos específicos, así como por tratamiento enzimático con glicosidasas.

3)- Optimización de línea reportera de infección viral.

En la parte final de nuestro trabajo de tesis logramos generar una línea celular estable reportera que tiene la capacidad de responder con una señal de fluorescencia por GFP a la infección por VLB. Los resultados preliminares obtenidos utilizando como fuente de infección al co-cultivo con células FLK persistentemente infectadas fueron muy promisorios generando señales de fluorescencia muy importantes.

Como perspectivas de este trabajo en primer lugar proponemos terminar de optimizar y caracterizar esta nueva herramienta mediante: 1)- realización de un análisis de correlación con resultados obtenidos en paralelo con el ensayo de formación de sincicios, 2)- evaluar la respuesta de sistema reportero frente a la expresión de la proteína Tax, mediante la transfección transitoria de las líneas reporteras con un plásmido que exprese Tax, 3)- optimizar un ensayo que nos permita cuantificar en forma global mediante medida fluorimétrica en placa la capacidad infectiva de una muestra sin necesidad de realizar recuentos celulares. Lograr un ensayo que nos brinde información cuantitativa sobre la infectividad de una muestra y que se realice en formato de microplaca podría ser de máxima utilidad para obtener información útil en el manejo veterinario.

En segundo lugar, y en relación a lo previo, proponemos optimizar el uso de este sistema reportero para poder identificar la capacidad infectiva de VLB presente en diferentes muestras biológicas de importancia en el manejo veterinario de los bovinos. En particular nos interesa poder cuantificar la infectividad de muestras de sangre, de calostro, de leche, de semen, de fluidos mucosos, etc. Estas muestras pueden ser analizadas a partir de muestras extraídas de maniobras veterinarias frecuentes en el manejo de los sistemas de producción ganadero como muestras sanguíneas presentes en agujas de venopunción, fluidos mucosos en guantes utilizados por inseminadores, muestras de calostro utilizadas para alimentación inicial de terneros, muestras biológicas presentes en tubo digestivo de insectos hematófagos, etc. Asimismo, una vez optimizado el ensayo reportero de infectividad para este tipo de muestras biológicas de campo, podría ser utilizado para medir el efecto de diferentes medidas desinfectantes sobre la infectividad, como tratamiento térmico, uso de desinfectantes específicos y otros métodos de inactivación viral.

En tercer lugar, esta línea reportera será también muy útil para el desarrollo de líneas de investigación básica actualmente en marcha en nuestro laboratorio. En particular aquellas líneas de trabajo que focalizan la investigación en moléculas con actividad anti-viral (p.e. compuestos inhibidores de la proteasa

de VLB) o moléculas con capacidad de neutralizar la infección (p.e. anticuerpos monoclonales específicos y sus derivados de menor tamaño) podrían tener en este sistema reportero una herramienta de análisis muy relevante.

Por último, simplemente destacar la importancia que tiene poder generar desde el laboratorio de investigación básica nuevos conocimientos y nuevas herramientas tecnológicas que nos permitan como perspectiva poder transferirlos al sector productivo nacional y que puedan ser útiles finalmente para mejorar la calidad de vida de todos.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, Barthold SW, et al (2017) Chapter 14 – Retroviridae. Fenner's Vet Virol 269–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00014-3>
2. Kettmann R, Portetelle D, Mammerickx M, et al (1976) Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proc Natl Acad Sci* 73:1014–1018. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.4.1014>
3. Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, et al (2011) Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV. *Viruses* 3:1210–1248. <https://doi.org/10.3390/v3071210>
4. Burny A, Bex F, Chantrenng H, et al (1978) Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Adv Cancer Res*. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60649-1](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60649-1)
5. ICTV Master Species List 2018a v1
6. Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, et al (1988) Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet Microbiol* 17:197–218. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90066-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90066-1)
7. Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, et al (2010) Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:577–589
8. Tsujimoto H, Noda Y, Ishikawa K, et al (1987) Development of Adult T-Cell Leukemia-like Disease in African Green Monkey Associated with Clonal Integration of Simian T-Cell Leukemia Virus Type I. *Cancer Res* 47:
9. Fenner's Veterinary Virology
10. Polat M, Takeshima SN, Aida Y (2017) Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol. J.* 14
11. Polat M, Takeshima S nosuke, Hosomichi K, et al (2016) A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology* 13:. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0239-z>
12. Ochirkhuu N, Konnai S, Odbileg R, et al (2016) Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle. *Arch Virol* 161:985–991. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2676-8>
13. Lee EJ, Kim EJ, Ratthanophart J, et al (2016) Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infect Genet Evol* 41:245–254. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.010>
14. Bazzucchi M, Iscaro C, Casciari C, et al (2019) Molecular characterization of Italian bovine leukemia virus isolates reveals the presence of distinct phylogenetic clusters. *Arch Virol* 164:1697–1703. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04255-4>
15. Ababneh MM, Al-Rukibat RK, Hananeh WM, et al (2012) Detection and molecular characterization of bovine leukemia viruses from Jordan. *Arch Virol* 157:2343–2348. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1447-z>
16. Corredor-Figueroa AP, Salas S, Olaya-Galán NN, et al (2020) Prevalence and molecular epidemiology of bovine leukemia virus in Colombian cattle. *Infect Genet Evol* 80:104171. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104171>
17. Yu C, Wang X, Zhou Y, et al (2019) Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of

- Heilongjiang, northeastern China. *BMC Vet Res* 15:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1863-3>
18. Moratorio G, Obal G, Dubra A, et al (2010) Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch Virol* 155:481–489. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0606-3>
 19. Polat M, Moe HH, Shimogiri T, et al (2017) The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle. *Arch Virol* 162:425–437. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3118-y>
 20. Gillet N, Florins A, Boxus M, et al (2007) Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4:18. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
 21. Calafat J, Ressang AA (1977) Morphogenesis of bovine leukemia virus. *Virology*. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(77\)90379-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(77)90379-8)
 22. Schiller J, Chackerian B (2014) Why HIV Virions Have Low Numbers of Envelope Spikes: Implications for Vaccine Development. *PLoS Pathog*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004254>
 23. Zhu P, Chertova E, Bess J, et al (2003) Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2634931100>
 24. Briggs JAG, Kräusslich HG (2011) The molecular architecture of HIV. *J. Mol. Biol.*
 25. Li S, Hill CP, Sundquist WI, Finch JT (2000) Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35030177>
 26. Ganser-Pornillos BK, von Schwedler UK, Stray KM, et al (2004) Assembly Properties of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 CA Protein. *J Virol*. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2545-2552.2004>
 27. Fields BN, Knipe DM HP (2013) *Fundamental Virology*
 28. Florins A, Gillet N, Boxus M, et al (2007) Even Attenuated Bovine Leukemia Virus Proviruses Can Be Pathogenic in Sheep. *J Virol*. <https://doi.org/10.1128/jvi.01058-07>
 29. Durkin K, Rosewick N, Artesi M, et al (2016) Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology*. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0267-8>
 30. Bai L, Sato H, Kubo Y, et al (2019) CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection. *FASEB J*. <https://doi.org/10.1096/fj.201901528R>
 31. Rosewick N, Durkin K, Artesi M, et al (2017) Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15264>
 32. Murakami H, Yamada T, Suzuki M, et al (2011) Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. *Virus Res*. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.004>
 33. Sundquist WI, Kräusslich HG (2012) HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*.
 34. Carlton JG, Martin-Serrano J (2007) Parallels between cytokinesis and retroviral budding: A role

- for the ESCRT machinery. *Science* (80-). <https://doi.org/10.1126/science.1143422>
35. Nisole S, Stoye JP, Saïb A (2005) TRIM family proteins: Retroviral restriction and antiviral defence. *Nat. Rev. Microbiol.*
 36. Zarkik S, Decroly E, Wattiez R, et al (1997) Comparative processing of bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp72 by subtilisin/kexin-like mammalian convertases. *FEBS Lett.* [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00275-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00275-5)
 37. Gatot J-S, Callebaut I, Van Lint C, et al (2002) Bovine Leukemia Virus SU Protein Interacts with Zinc, and Mutations within Two Interacting Regions Differently Affect Viral Fusion and Infectivity In Vivo. *J Virol.* <https://doi.org/10.1128/jvi.76.16.7956-7967.2002>
 38. Johnston ER, 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.* <https://doi.org/10.1128/jvi.74.6.2930-2935.2000>
 39. Johnston ER, Albritton LM, 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. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.21.10861-10872.2002>
 40. Lamb D, Schüttelkopf AW, van Aalten DMF, Brighty DW (2011) Charge-surrounded pockets and electrostatic interactions with small ions modulate the activity of retroviral fusion proteins. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001268>
 41. de Brogniez A, Mast J, Willems L (2016) Determinants of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoproteins Involved in Infectivity, Replication and Pathogenesis. *Viruses* 8:88. <https://doi.org/10.3390/v8040088>
 42. Li K, Zhang S, Kronqvist M, et al (2008) Intersubunit Disulfide Isomerization Controls Membrane Fusion of Human T-Cell Leukemia Virus Env. *J Virol* 82:7135–7143. <https://doi.org/10.1128/JVI.00448-08>
 43. ER J, K R (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. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.6.2930-2935.2000>
 44. Wallin M, Ekström M, Garoff H (2004) Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *EMBO J* 23:54–65. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600012>
 45. Zhao X, Buehring GC (2007) Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: Possible effects of selection and escape. *Virology* 366:150–165. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.058>
 46. Bai L, Takeshima S nosuke, Isogai E, et al (2015) Novel CD8+ cytotoxic T cell epitopes in bovine leukemia virus with cattle. *Vaccine.* <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.128>
 47. de Brogniez A, Bouzar AB, Jacques J-R, et al (2015) Mutation of a Single Envelope N-Linked Glycosylation Site Enhances the Pathogenicity of Bovine Leukemia Virus. *J Virol.* <https://doi.org/10.1128/jvi.00261-15>
 48. G M, R L (1992) HIV glycosylation: what does it portend? *AIDS Res Hum Retroviruses* 8:1459–1460. <https://doi.org/10.1089/AID.1992.8.1459>
 49. Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R (1985) Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* (80-) 230:453–455. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2996136>

50. J D, C P, T V, et al (1996) The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 12:442–150. <https://doi.org/10.1097/00042560-199608150-00002>
51. Ruegg CL, Monell CR, Strand M (1989) Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 63:3257–3260. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.8.3257-3260.1989>
52. Haraguchi S, Good RA, Day NK (1995) Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunol Today* 16:595–603. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80083-2](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80083-2)
53. Mangeney M, Heidmann T (1998) Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14920–14925. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.25.14920>
54. Morozov VA, Morozov A V., Semaan M, Denner J (2012) Single mutations in the transmembrane envelope protein abrogate the immunosuppressive property of HIV-1. *Retrovirology*. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-67>
55. JS G, I C, JP M, et al (1998) Conservative mutations in the immunosuppressive region of the bovine leukemia virus transmembrane protein affect fusion but not infectivity in vivo. *J Biol Chem* 273:12870–12880. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.21.12870>
56. A M, S B, K H, et al (2007) Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. *Placenta* 28:185–191. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2006.03.001>
57. S B, N de P, L B, T H (2003) Genome wide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13013–13018. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2132646100>
58. JL B, D L, V C, et al (2000) An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol* 74:3321–3329. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3321-3329.2000>
59. M M, M R, G S-L, et al (2007) Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20534–20539. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0707873105>
60. MP G, V B, L D, et al (2000) Identification of two intracellular mechanisms leading to reduced expression of oncoretrovirus envelope glycoproteins at the cell surface. *J Virol* 74:11734–11743. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.24.11734-11743.2000>
61. Willems L, Gatot JS, Mammerickx M, et al (1995) The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads. *J Virol* 69:4137
62. Freed EO (1998) HIV-1 Gag proteins: Diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251:1–15. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9398>
63. Kakker NK, Mikhailov M V., Nermut M V., et al (1999) Bovine leukemia virus Gag particle assembly in insect cells: Formation of chimeric particles by domain-switched leukemia/lentivirus Gag polyprotein. *Virology* 265:308–318. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0007>
64. Mager A, Masengo R, Mammerickx M, Letesson J-J (1994) T cell proliferative response to bovine leukaemia virus (BLV): identification of T cell epitopes on the major core protein (p24) in BLV-infected cattle with normal haematological values

65. KG T, DM P-F, S D, et al (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. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00420-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00420-5)
66. Otta SL, Johnson R, Wells SJ (2003) Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med* 61:249–262. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.08.003>
67. RM J, JL H, MA G, et al (1991) Production and related variables in bovine leukaemia virus-infected cows. *Vet Res Commun* 15:463–474. <https://doi.org/10.1007/BF00346546>
68. J B, M V-H, D S, Z T (1989) The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. *Vet Immunol Immunopathol* 22:299–305. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(89\)90017-2](https://doi.org/10.1016/0165-2427(89)90017-2)
69. VanLeeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, et al (2010) Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Prev Vet Med* 94:54–64. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.012>
70. RJ E, PC B, TM B, et al (2012) Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci* 95:727–734. <https://doi.org/10.3168/JDS.2011-4760>
71. Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima SN (2013) Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol* 4:328. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00328>
72. Gutiérrez G, Rodríguez SM, De Brogniez A, et al (2014) Vaccination against δ -retroviruses: The bovine leukemia virus paradigm. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v6062416>
73. Fulton BE, Portella M, Radke K (2006) Dissemination of Bovine Leukemia Virus-Infected Cells from a Newly Infected Sheep Lymph Node. *J Virol* 80:7873–7884. <https://doi.org/10.1128/JVI.00529-06>
74. Doménech A, Goyache J, Llamas L, et al (2000) In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J Gen Virol* 81:109–118. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-109>
75. M A, V R, J N, et al (2002) Reduced IL-2 and IL-4 mRNA expression in CD4+ T cells from bovine leukemia virus-infected cows with persistent lymphocytosis. *Virology* 304:1–9. <https://doi.org/10.1006/VIRO.2002.1651>
76. D P, GA S (1998) Interleukin-12 p40 mRNA expression in bovine leukemia virus-infected animals: increase in alymphocytosis but decrease in persistent lymphocytosis. *J Virol* 72:6917–6921. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.8.6917-6921.1998>
77. Z T, J B, R M, H U-W (1996) Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 54:293–302. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05706-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05706-6)
78. LM S, CR H, GM P (1994) Altered interleukin-2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus-infected cattle. *Proc Soc Exp Biol Med* 207:268–273. <https://doi.org/10.3181/00379727-207-43815>
79. ES T, WC B, GH P, et al (1998) B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. *J Virol* 72:3169–

3177. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.4.3169-3177.1998>
80. H K, K O, M O (2001) Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *J Vet Med Sci* 63:703–708. <https://doi.org/10.1292/JVMS.63.703>
 81. DM S, AJ H, WC D (1995) Up-regulation of IL-2 receptor alpha and MHC class II expression on lymphocyte sub populations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows. *Vet Immunol Immunopathol* 48:65–76. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05423-4](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05423-4)
 82. R M, S M, J B (1997) Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers on infected lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 59:113–119. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00056-1)
 83. R I, S K, T S, et al (2011) Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses in vitro via PD-L1 blockade. *Vet Res* 42:. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-103>
 84. S K, S S, T S, et al (2013) Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cattle infected with bovine leukemia virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36:63–69. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2012.09.005>
 85. R I, S K, T O, et al (2013) Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. *Vet Res* 44:. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-59>
 86. T O, S K, R I, et al (2012) Increased bovine Tim-3 and its ligand expressions during bovine leukemia virus infection. *Vet Res* 43:. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-45>
 87. S S, S K, T O, et al (2013) Expression analysis of Foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle. *Microbiol Immunol* 57:600–604. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12073>
 88. Frie MC, Coussens PM (2015) Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*
 89. Zhao T, Matsuoka M (2012) HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis. *Front Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00247>
 90. Barez PY, de Brogniez A, Carpentier A, et al (2015) Recent advances in BLV research. *Viruses* 7:6080–6088. <https://doi.org/10.3390/v7112929>
 91. D P, M M, A B (1989) Use of two monoclonal antibodies in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus envelope protein gp51. *J Virol Methods* 23:211–222. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(89\)90135-3](https://doi.org/10.1016/0166-0934(89)90135-3)
 92. K R, D G, LC K (1990) Humoral immune response of experimentally infected sheep defines two early periods of bovine leukemia virus replication. *Microb Pathog* 9:159–171. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(90\)90019-M](https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90019-M)
 93. Florins A, Gillet N, Asquith B, et al (2007) Cell dynamics and immune response to BLV infection: A unifying model. *Front Biosci* 12:1520–1531. <https://doi.org/10.2741/2165>
 94. Portetelle D, Bruck C, Burny A, et al (1978) Detection of complement-dependent lytic antibodies in sera from bovine leukemia virus-infected animals. *Ann Rech Vet* 9:667–674
 95. Hopkins SG, DiGiacomo RF (1997) Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13:107–128. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30367-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30367-4)
 96. Perino LJ, Wright RE, Hoppe KL, Fulton RW (1990) Bovine leukosis virus transmission with

- mouthparts from *Tabanus abactor* after interrupted feeding. *Am J Vet Res* 51:1167–1169
97. Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a California dairy - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1653640/>. Accessed 18 May 2021
 98. Protection of colostrum antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2556213/>. Accessed 18 May 2021
 99. Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, et al (2012) Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. *J Dairy Res* 79:445–450. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000520>
 100. Sellers TA, Vierkant RA, Djeu J, et al Unpasteurized Milk Consumption and Subsequent Risk of Cancer. <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9143-8>
 101. Burmeister T, Schwartz S, Hummel M, et al (2007) No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. *Retrovirology* 4:11. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-11>
 102. Perzova RN, Loughran TP, Dube S, et al (2000) Lack of BLV and PTLV DNA sequences in the majority of patients with large granular lymphocyte leukaemia. *Br J Haematol* 109:64–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01972.x>
 103. Olaya-Galán NN, Corredor-Figueroa AP, Guzmán-Garzón TC, et al (2017) Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. *Epidemiol Infect* 145:3125–3130. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002229>
 104. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY (2003) Humans Have Antibodies Reactive with Bovine Leukemia Virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19:1105–1113. <https://doi.org/10.1089/088922203771881202>
 105. Giovanna M, Carlos UJ, María UA, Fernanda Gutierrez M (2013) Bovine Leukemia Virus Gene Segment Detected in Human Breast Tissue. *Open J Med Microbiol* 3:84–90. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2013.31013>
 106. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, et al (2014) Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis* 20:772–782. <https://doi.org/10.3201/eid2005.131298>
 107. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, et al (2015) Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PLoS One* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134304>
 108. Buehring GC, Shen HM, Schwartz DA, Lawson JS (2017) Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. *PLoS One* 12:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179367>
 109. Schwingel D, Andreolla AP, Erpen LMS, et al (2019) Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. *Sci Rep* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7>
 110. Zhang R, Jiang J, Sun W, et al Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0763-8>
 111. Gillet NA, Willems L (2016) Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology* 13:75. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0308-3>
 112. Statement E (2015) EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); EFSA Panel on Animal

- Health and Welfare (AHAW). www.efsa.europa.eu/efsajournal EFSA J 13:.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015>
113. Rama G, Moratorio G, Greif G, et al (2011) Development of a real time PCR assay using SYBR Green chemistry for bovine leukemia virus detection. *Retrovirology* 8:A17.
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-s1-a17>
 114. G. Rama, A.Meikle, R. Puentes, G .Moratorio, P.Nicolini, P.Pessina, A.Furtado OP (2010) Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la fórmula leucocitaria | *Veterinaria (Montevideo)*.
<https://revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/163>. Accessed 16 May 2021
 115. (2013) Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay | *Veterinaria (Montevideo)*. In: A. Furtado,D. Rosadilla, G. Fr. J. Piaggio, R.Puentes.
<http://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/241>. Accessed 16 May 2021
 116. Andrés Addiego (2018) Desarrollo de un nuevo método diagnóstico para la Leucosis Bovina Enzoótica y su validación como herramienta para el control de la enfermedad . Programa para la Investigación Biomédica (PROINBIO): Universidad de la República, Uruguay
 117. Ladronka RM, Ainsworth S, Wilkins MJ, et al (2018) Prevalence of Bovine Leukemia Virus Antibodies in US Dairy Cattle. *Vet Med Int* 2018:.
<https://doi.org/10.1155/2018/5831278>
 118. VJ R, B N, OJ B, et al (2019) Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *J Dairy Sci* 102:9165–9175.
<https://doi.org/10.3168/JDS.2018-16186>
 119. Gutiérrez SE, Esteban EN, Lützelschwab CM, Juliarena MA (2017) Major Histocompatibility Complex-Associated Resistance to Infectious Diseases: The Case of Bovine Leukemia Virus Infection. *Trends Adv Vet Genet*. <https://doi.org/10.5772/65804>
 120. Miller JM, Van Der Maaten MJ (1978) Evaluation of an inactivated bovine leukemia virus preparation as an immunogen in cattle. *Ann Rech Vet*
 121. Parfanovich MI, Zhdanov VM, Lazarenko AA, et al (1983) The possibility of specific protection against bovine leukaemia virus infection and bovine leukaemia with inactivated blv. *Br Vet J* 139:137–146. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)30537-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)30537-7)
 122. J M Miller, M J Van der Maaten MJS (1983) Vaccination of cattle with binary ethylenimine-treated bovine leukemia virus - PubMed. *Am J Vet Res* 44:64–67
 123. Fukuyama, S.; Kodama, K.; Hirahara, T.; Nakajima, N.; Takamura, K.; Sasaki, O.; Imanishi J (1993) Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *J Vet Med Sci* 99–106
 124. Onuma M, Hodatsu T, Yamamoto S, et al (1984) Protection by vaccination against bovine leukemia virus infection in sheep. *Am J Vet Res*
 125. Kabeya H, Ohashi K, Ohishi K, et al (1996) An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine* 14:1118–1122.
[https://doi.org/10.1016/0264-410X\(96\)00047-3](https://doi.org/10.1016/0264-410X(96)00047-3)
 126. Burkhardt, H.; Rosenthal, S.; Wittmann, W.; Starick, E.; Scholz, D.; Rosenthal, H.A.; Kluge KH (1989) Immunization of young cattle with gp51 of the bovine leukosis virus and the subsequent experimental infection. *Arch Exp Vet* 43, 933–942.
 127. M M, J S, B S, et al (1991) Characterization of purified gp 51 from bovine leukemia virus integrated into iscom. Physicochemical properties and serum antibody response to the

- integrated gp51. *Arch Virol* 120:219–231. <https://doi.org/10.1007/BF01310477>
128. RZ M, M M, N R, et al (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. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.9.4180-4188.1990>
 129. C B, S M, D P, et al (1982) Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology* 122:342–352. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90234-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90234-3)
 130. C B, D P, A B, J Z (1982) Topographical analysis by monoclonal antibodies of BLV-gp51 epitopes involved in viral functions. *Virology* 122:353–362. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90235-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90235-5)
 131. C B, D P, M M, et al (1984) Epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51 recognized by sera of infected cattle and sheep. *Leuk Res* 8:315–321. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(84\)90070-5](https://doi.org/10.1016/0145-2126(84)90070-5)
 132. C B, N R, D P, et al (1984) Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability. *Virology* 136:20–31. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90244-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90244-7)
 133. D P, C B, M M, A B (1980) In animals infected by bovine leukemia virus (BLV) antibodies to envelope glycoprotein gp51 are directed against the carbohydrate moiety. *Virology* 105:223–233. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90169-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90169-5)
 134. D P, D C, C B, et al (1989) Antigenic variants of bovine leukemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH₂ part of the envelope glycoprotein gp51. *Virology* 169:27–33. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90037-8)
 135. D P, C D, A B, et al (1989) Synthetic peptides approach to identification of epitopes on bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51. *Virology* 169:34–41. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90038-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90038-X)
 136. Portetelle D, Limbach K, Burny A, et al (1991) Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukaemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection. *Vaccine*. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90153-W](https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90153-W)
 137. Callebaut I, Mornon JP, Burny A, Portetelle D (1994) The bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51 as a general model for the design of a subunit vaccine against retroviral infection: Mapping of functional sites through immunological and structural data. *Leukemia*
 138. MH G, HM N, S K, et al (1993) Protection of sheep against bovine leukemia virus (BLV) infection by vaccination with recombinant vaccinia viruses expressing BLV envelope glycoproteins: correlation of protection with CD4 T-cell response to gp51 peptide 51-70. *J Virol* 67:1803–1810. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.4.1803-1810.1993>
 139. K O, H K, H A, M O (1996) Induction of bovine leukaemia virus Env-specific Th-1 type immunity in mice by vaccination with short synthesized peptide-liposome. *Vaccine* 14:1143–1148. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(96\)00033-3](https://doi.org/10.1016/0264-410X(96)00033-3)
 140. Ohishi K (1997) Peptide-based bovine leukemia virus (BLV) vaccine that induces BLV-Env specific Th-1 type immunity. *Leukemia*
 141. Okada K, Sonoda K, Koyama M, et al (2003) Delayed-type hypersensitivity in sheep induced by synthetic peptides of bovine leukemia virus encapsulated in mannan-coated liposome. *J Vet Med Sci*. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.515>

142. AD H, MF G, L M, et al (1998) Vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes protect against retroviral challenge. *Nat Med* 4:1193–1196. <https://doi.org/10.1038/2690>
143. L M, J G, A S (2001) Delayed emergence of bovine leukemia virus after vaccination with a protective cytotoxic T cell-based vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1447–1453. <https://doi.org/10.1089/088922201753197114>
144. A Brillowska, S Dabrowski, J Ruřka, P Kubiř, E Buzafa JK (1999) Protection of cattle against bovine leukemia virus (BLV) infection could be attained by DNA vaccination - PubMed. *Acta Biochim Pol* 46:971–6
145. A V den B, M O, T B, et al (2010) Cytotoxic responses to BLV tax oncoprotein do not prevent leukemogenesis in sheep. *Leuk Res* 34:1663–1669. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2010.06.003>
146. S K, ME A, DB B, et al (1990) Expression of bovine leukaemia virus envelope gene by recombinant vaccinia viruses. *Virus Res* 17:131–142. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(90\)90074-L](https://doi.org/10.1016/0168-1702(90)90074-L)
147. K O, Y I (1996) T cell-mediated destruction of bovine leukemia virus-infected peripheral lymphocytes by bovine leukemia virus env-vaccinia recombinant vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:393–398. <https://doi.org/10.1089/AID.1996.12.393>
148. Cherney TM, Schultz RD (1996) Viral status and antibody response in cattle inoculated with recombinant bovine leukemia virus-vaccinia virus vaccines after challenge exposure with bovine leukemia virus-infected lymphocytes. *Am J Vet Res* 57:812–818
149. BR VB, WC B, DM E, et al (1999) Development and in vitro characterization of recombinant vaccinia viruses expressing bovine leukemia virus gp51 in combination with bovine IL4 or IL12. *Vaccine* 17:384–395. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00208-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00208-4)
150. Abdala A, Alvarez I, Brossel H, et al (2019) BLV: lessons on vaccine development. *Retrovirology* 16:26. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0488-8>
151. Rodríguez SM, Gutiérrez G, Gillet N, et al (2014) A recombinant attenuated candidate vaccine that efficiently and persistently protects against bovine leukemia virus in herds. *Retrovirology* 2014:10. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-S1-O10>
152. Nooraei S, Bahrulolum H, Sadat Hoseini Z, et al (2021) Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J Nanobiotechnol* 19:59. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>
153. Jeong H, Seong BL (2017) Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections. *J Microbiol* 55:220–230. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7058-3>
154. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V (2012) Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 31:58–83. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>
155. Pushko P, Pumpens P, Grens E (2013) Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology* 56:141–165. <https://doi.org/10.1159/000346773>
156. Crisci E, Bárcena J, Montoya M (2012) Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.*
157. E C, J B, M M (2013) Virus-like particle-based vaccines for animal viral infections. *Inmunologia* 32:102–116. <https://doi.org/10.1016/J.INMUNO.2012.08.002>

158. Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L (2017) Production of virus-like particles for vaccines. *N. Biotechnol.*
159. Liu F, Ge S, Li L, et al (2012) Virus-like particles: Potential veterinary vaccine immunogens. *Res. Vet. Sci.*
160. Charlton Hume HK, Vidigal J, Carrondo MJT, et al (2019) Synthetic biology for bioengineering virus-like particle vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* 116:919–935
161. Wang H, Norris KM, Mansky LM (2002) Analysis of Bovine Leukemia Virus Gag Membrane Targeting and Late Domain Function. *J Virol* 76:8485–8493. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.16.8485-8493.2002>
162. Kakker NK, Mikhailov M V., Jones IM, Roy P (2002) Comparative analysis of the roles of simian immunodeficiency and bovine leukemia virus matrix proteins in Gag assembly in insect cells. *Virology* 299:48–55. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1441>
163. Otsuki H, Takeshima S, Aida Y (2015) Generation of virus-like particle as a vaccine strategy against bovine leukemia virus. *Retrovirology*. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-12-s1-p47>
164. R N, P R (2003) Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol* 11:438–444. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00208-7)
165. R P, L DB, A A, et al (2016) Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res* 12:. <https://doi.org/10.1186/S12917-016-0749-X>
166. Yang L, Song Y, Li X, et al (2012) HIV-1 Virus-Like Particles Produced by Stably Transfected *Drosophila* S2 Cells: a Desirable Vaccine Component. *J Virol*. <https://doi.org/10.1128/JVI.07164-11>
167. Krey T, D’Alayer J, Kikuti CM, et al (2010) The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000762>
168. Tomé Poderti LM (2014) Estudio de la interacción entre el virus de la leucemia bovina y la célula hospedera. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA
169. Andrés Addiego (2018) Desarrollo de nuevo método diagnóstico para Leucosis Bovina Enzoótica y su validación como herramienta para el control de la enfermedad. Universidad de la República
170. Rizzo G, Forti K, Serroni A, et al (2016) Single N -glycosylation site of bovine leukemia virus SU is involved in conformation and viral escape. *Vet Microbiol* 197:21–26. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.024>
171. J C, XY Z, J R (2005) Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5:387–398. <https://doi.org/10.2174/1566523054546224>
172. Astray RM, Suárez-Patiño SF, Jorge SAC (2016) Expression of viral envelope glycoproteins in *drosophila melanogaster* S2 cells. In: *Methods in Molecular Biology*
173. Adriaan de Jongh W, Salgueiro S, Dyring C (2013) The use of *Drosophila* S2 cells in R&D and bioprocessing . *Pharm Bioprocess*. <https://doi.org/10.4155/pbp.13.18>
174. Zitzmann J, Sprick G, Weidner T, et al (2017) Process Optimization for Recombinant Protein Expression in Insect Cells. In: *New Insights into Cell Culture Technology*
175. Johansson DX, Krey T, Andersson O (2012) Production of recombinant antibodies in *drosophila melanogaster* s2 cells. *Methods Mol Biol*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-974-7_21

176. Callebaut I, Vonèche V, Mager A, et al (1993) Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *J Virol*. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.9.5321-5327.1993>
177. Ellis EA (2014) Staining sectioned biological specimens for transmission electron microscopy: Conventional and En Bloc stains. *Methods Mol Biol* 1117:57–72. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-776-1_4
178. González-Domínguez I, Gutiérrez-Granados S, Cervera L, et al (2016) Identification of HIV-1–Based Virus-like Particles by Multifrequency Atomic Force Microscopy. *Biophys J* 111:1173–1179. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.07.046>
179. Tagliamonte M, Visciano ML, Tornesello ML, et al (2011) HIV-Gag VLPs presenting trimeric HIV-1 gp140 spikes constitutively expressed in stable double transfected insect cell line. *Vaccine* 29:4913–4922. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.004>
180. Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Martínez M, et al (2013) Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *J Biotechnol* 166:152–165. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.05.001>
181. Gutiérrez-Granados S, Cervera L, Gòdia F, et al (2013) Development and validation of a quantitation assay for fluorescently tagged HIV-1 virus-like particles. *J Virol Methods* 193:85–95. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.05.010>
182. González-Domínguez I, Puente-Massaguer E, Cervera L, Gòdia F (2020) Quality assessment of virus-like particles at single particle level: A comparative study. *Viruses* 12:1–24. <https://doi.org/10.3390/v12020223>
183. Lynch A, Meyers AE, Williamson AL, Rybicki EP (2012) Stability studies of HIV-1 Pr55gag virus-like particles made in insect cells after storage in various formulation media. *Virol J* 9:1. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-210>
184. Valley-Omar Z, Meyers AE, Shephard EG, et al (2011) Abrogation of contaminating RNA activity in HIV-1 Gag VLPs. *Virol J* 8:1–12. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-462>
185. Steppert P, Burgstaller D, Klausberger M, et al (2016) Purification of HIV-1 gag virus-like particles and separation of other extracellular particles. *J. Chromatogr. A* 1455:93–101
186. Gelderblom HR, Reupke H, Pauli G (1985) LOSS OF ENVELOPE ANTIGENS OF HTLV-III/LAV, A FACTOR IN AIDS PATHOGENESIS? *Lancet*
187. McKeating JA, McKnight A, Moore JP (1991) Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization. *J Virol*. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.2.852-860.1991>
188. Pan Y, Ma B, Keskin O, Nussinov R (2004) Characterization of the conformational state and flexibility of HIV-1 glycoprotein gp120 core domain. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404364200>
189. Rutten L, Lai YT, Blokland S, et al (2018) A Universal Approach to Optimize the Folding and Stability of Prefusion-Closed HIV-1 Envelope Trimers. *Cell Rep* 23:584–595. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.061>
190. Sliepen K, Han BW, Bontjer I, et al (2019) Structure and immunogenicity of a stabilized HIV-1 envelope trimer based on a group-M consensus sequence. *Nat Commun* 10:1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10262-5>

191. Rawi R, Rutten L, Lai YT, et al (2020) Automated Design by Structure-Based Stabilization and Consensus Repair to Achieve Prefusion-Closed Envelope Trimers in a Wide Variety of HIV Strains. *Cell Rep* 33:108432. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108432>
192. Wang Q, Ma B, Liang Q, et al (2020) Stabilized diverse HIV-1 envelope trimers for vaccine design. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1745093>
193. Gonelli CA, King HAD, Mackenzie C, et al (2021) Immunogenicity of HIV-1-Based Virus-Like Particles with Increased Incorporation and Stability of Membrane-Bound Env. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030239>
194. Wang B-Z, Liu W, Kang S-M, et al (2007) Incorporation of High Levels of Chimeric Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoproteins into Virus-Like Particles. *J Virol* 81:10869–10878. <https://doi.org/10.1128/jvi.00542-07>
195. AW S, R E, J J, et al (2020) Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature* 577:706–710. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1923-7>
196. Künnapuu J, Björkgren I, Shimmi O (2009) The Drosophila DPP signal is produced by cleavage of its proprotein at evolutionary diversified furin-recognition sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809885106>
197. Kido H, Niwa Y, Beppu Y, Towatari T (1996) Cellular proteases involved in the pathogenicity of enveloped animal viruses, human immunodeficiency virus, influenza virus A and sendal virus. In: *Advances in Enzyme Regulation*
198. Seidah, N.G.; Pasquato, A.; Andreo U (2021) How Do Enveloped Viruses Exploit the Secretory Proprotein Convertases to Regulate Infectivity and Spread?. *Preprints 2021*, 2021040469. 1–24
199. Li SW, Wright M, Healey JF, et al (2020) Gene editing in CHO cells to prevent proteolysis and enhance glycosylation: Production of HIV envelope proteins as vaccine immunogens. *PLoS One* 15:. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0233866>
200. Rendić D, Wilson IBH, Paschinger K (2008) The glycosylation capacity of insect cells. In: *Croatia Chemica Acta*
201. Wilson IBH (2002) Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
202. RA U, R W, JE S, et al (2019) Antigenicity and Immunogenicity of Differentially Glycosylated Hepatitis C Virus E2 Envelope Proteins Expressed in Mammalian and Insect Cells. *J Virol* 93:. <https://doi.org/10.1128/JVI.01403-18>
203. Reiter K, Aguilar PP, Wetter V, et al (2019) Separation of virus-like particles and extracellular vesicles by flow-through and heparin affinity chromatography. *J Chromatogr A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.035>
204. Kerkhofs P, Gatot JS, Knapen K, et al (2000) Long-term protection against bovine leukaemia virus replication in cattle and sheep. *J Gen Virol* 81:957–963. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-4-957>
205. Reichert M, Cantor GH, Willems L, Kettmann R (2000) Protective effects of a live attenuated bovine leukaemia virus vaccine with deletion in the R3 and G4 genes. *J Gen Virol* 81:965–969. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-4-965>
206. Ban J, Czene S, Altaner C, et al (1992) Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukaemia virus external glycoproteins expressed in *Escherichia coli* by means of anti-peptide antibodies. *J Gen Virol*. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-9-2457>

207. A D, L L, J G, et al (1997) Macrophages infected with bovine leukaemia virus (BLV) induce humoral response in rabbits. *Vet Immunol Immunopathol* 58:309–320. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00043-3)
208. M O, S W, M S, et al (1980) Detection of bovine leukemia virus by syncytium assay. *Can J Comp Med Rev Can Med Comp* 44:289–293
209. Greig AS, Chander S, Samagh B, Bouillant AMP (1978) A simple, rapid syncytial-inhibition test for antibodies to bovine leukemia virus. *Can J Comp Med* 42:446–451
210. C A Diglio JFF Induction of syncytia by the bovine C-type leukemia virus - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/175949/>. Accessed 18 Oct 2021
211. Graves DC, Ferrer JF (1976) In Vitro Transmission and Propagation of the Bovine Leukemia Virus in Monolayer Cell Cultures. *Cancer Res* 36:
212. Onuma M, Watarai S, Mikami T, Izawa H (1980) Cell fusion activity of bovine leukaemia virus. *J Gen Virol* 48:421–424. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-48-2-421>
213. DC G, LV J (1981) Early syncytium formation by bovine leukemia virus. *J Virol* 38:1055–1063. <https://doi.org/10.1128/JVI.38.3.1055-1063.1981>
214. KMS S, A A, PJ S, et al (2017) Breaching peripheral tolerance promotes the production of HIV-1-neutralizing antibodies. *J Exp Med* 214:2283–2302. <https://doi.org/10.1084/JEM.20161190>
215. GI R, HFJ S, HK P (2020) Current Understanding of Natural Antibodies and Exploring the Possibilities of Modulation Using Veterinary Models. A Review. *Front Immunol* 11:. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.02139>
216. A B, A C, C M, P P (1988) The origin of “natural antibodies” and the internal activity in the immune system. *Int Rev Immunol* 3:47–58. <https://doi.org/10.3109/08830188809051181>
217. J B, O J-A, U S, et al (1992) Human monoclonal IgM antibodies from foetal B-cell hybridomas directed against a surface antigen on human tumour cells. *Res Immunol* 143:879–891. [https://doi.org/10.1016/0923-2494\(92\)80111-W](https://doi.org/10.1016/0923-2494(92)80111-W)
218. M Adib, J Ragimbeau, S Avrameas TT IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2246515/>. Accessed 11 Oct 2021
219. SV K, GJ S, J B (2012) Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol* 188:939–945. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1102107>
220. B G, W M, M G, et al (1985) Presence of natural autoantibodies in hyperimmunized mice. *Immunology* 56:401–408
221. S P, JL D (2015) Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol* 194:13–20. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1400844>
222. I Aksentijevich, D H Sachs MS Natural antibodies against bone marrow cells of a concordant xenogeneic species - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2051029/>. Accessed 11 Oct 2021
223. S Ménard, M I Colnaghi ET (1981) Correlation between the presence of natural antitumor antibodies and activation of MuLV endogenous virus in BALB/c mice - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6274069/>. Accessed 21 Sep 2021
224. A Lawoko, B Johansson, D Rabinayaran, R Pipkorn JB Increased immunoglobulin G, but not M, binding to endogenous retroviral antigens in HIV-1 infected persons - PubMed

225. J M Dwyer CJ The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6461456/>. Accessed 11 Oct 2021
226. L V-S, A V-R, LL R, MV B (2019) The Role of Interleukin 6 During Viral Infections. *Front Microbiol* 10:. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01057>
227. R Meiom , S Moss, J Brenner, D Heller ZT (1997) Levels and role of cytokines in bovine leukemia virus (BLV) infection - PubMed. In: *Leukemia*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9209346/>. Accessed 20 Oct 2021
228. A N, S K, T O, et al (2017) In vitro and in vivo antiviral activity of an anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) rat-bovine chimeric antibody against bovine leukemia virus infection. *PLoS One* 12:. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0174916>
229. S L, X L, L F, et al (2010) The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol* 7:182–189. <https://doi.org/10.1038/CMI.2010.22>
230. Sahu U, Biswas D, Prajapati VK, et al (2021) Interleukin-17—A multifaceted cytokine in viral infections. *J Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1002/JCP.30471>
231. WT M, XT Y, Q P, DK C (2019) The protective and pathogenic roles of IL-17 in viral infections: friend or foe? *Open Biol* 9:. <https://doi.org/10.1098/RSOB.190109>
232. A H, VP R, J K, et al (2009) Subpopulations of bovine WC1(+) gammadelta T cells rather than CD4(+)CD25(high) Foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Vet Res* 40:. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2008044>
233. T U, S K, K O, M O (2007) Interferon-gamma expression associated with suppression of bovine leukemia virus at the early phase of infection in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 115:17–23. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2006.09.011>
234. MVN F, PA L, M M, et al (2016) Toll-like receptors, IFN- γ and IL-12 expression in bovine leukemia virus-infected animals with low or high proviral load. *Res Vet Sci* 107:190–195. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2016.06.016>
235. VA M, VL DT, J D (2013) The transmembrane protein of the human endogenous retrovirus--K (HERV-K) modulates cytokine release and gene expression. *PLoS One* 8:. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0070399>
236. SJ T, R K, J D (2000) Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology* 268:87–93. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1999.0149>
237. Mühle M, Lehmann M, Hoffmann K, et al (2017) Antigenic and immunosuppressive properties of a trimeric recombinant transmembrane envelope protein gp41 of HIV-1. *PLoS One* 12:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173454>
238. A K, S H, EN B, et al (1997) HIV-1 recombinant gp41 induces IL-10 expression and production in peripheral blood monocytes but not in T-lymphocytes. *Immunol Lett* 55:109–113. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(97\)02695-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(97)02695-3)
239. C S, B J, M B, MP D (2000) HIV-1 envelope protein gp41 modulates expression of interleukin-10 and chemokine receptors on monocytes, astrocytes and neurones. *AIDS* 14:629–636. <https://doi.org/10.1097/00002030-200004140-00001>
240. S T, EC B, M I, et al (1995) Induction of IL-6 and IL-10 production by recombinant HIV-1 envelope glycoprotein 41 (gp41) in the THP-1 human monocytic cell line. *Cell Immunol* 165:234–242. <https://doi.org/10.1006/CIMM.1995.1210>

241. M B, L K, C S, MP D (1998) gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin (IL)-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon-gamma production. *J Infect Dis* 177:905–913. <https://doi.org/10.1086/515230>
242. D I, H P, J K, J D (2018) Absence of IL-10 production by human PBMCs co-cultivated with human cells expressing or secreting retroviral immunosuppressive domains. *PLoS One* 13:. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0200570>
243. Calomme C, Dekoninck A, Nizet S, et al (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. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.24.13848-13864.2004>
244. Sagata N, Yasunaga T, Ogawa Y, et al (1984) Bovine leukemia virus: Unique structural features of its long terminal repeats and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4741–4745. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.15.4741>
245. Xiao J, Buehring GC (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. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.7.5994-6003.1998>
246. 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. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.23.10939-10949.2000>
247. Harms JS, Eakle KA, Kuo LS, et al (2004) Comparison of bovine leukemia virus (BLV) and CMV promoter-driven reporter gene expression in BLV-infected and non-infected cells. *Genet Vaccines Ther* 2:. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-2-11>
248. Sato H, Watanuki S, Murakami H, et al (2018) Development of a luminescence syncytium induction assay (LuSIA) for easily detecting and quantitatively measuring bovine leukemia virus infection. *Arch Virol* 163:1519–1530. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3744-7>
249. Sato H, Watanuki S, Bai L, et al (2019) A sensitive luminescence syncytium induction assay (LuSIA) based on a reporter plasmid containing a mutation in the glucocorticoid response element in the long terminal repeat U3 region of bovine leukemia virus. *Virol J* 16:. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1172-2>
250. Jewell NA, Mansky LM (2005) Construction and characterization of deltaretrovirus indicator cell lines. *J Virol Methods* 123:17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.09.002>
251. Inabe K, Ikuta K, Aida Y (1998) Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine leukemia virus. *Virology* 245:53–64. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9140>
252. Elegheert J, Behiels E, Bishop B, et al (2018) Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins. *Nat Protoc* 13:2991–3017. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0075-9>
253. Suzuki T, Ikeda H, Mase M (2018) Restricted viral cDNA synthesis in cell lines that fail to support productive infection by bovine leukemia virus. *Arch Virol* 163:2415–2422. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3887-6>
254. Yoshikawa R, Shimode S, Sakaguchi S, Miyazawa T (2014) Contamination of live attenuated vaccines with an infectious feline endogenous retrovirus (RD-114 virus). *Arch Virol* 159:399–404. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1809-1>

255. 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. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.8.2462-2471.1987>
256. Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, et al (1997) Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8784>
257. Obal G (2014) Bases biofísicas y estructurales del ensamblado de la cápside retroviral : virus de la leucemia bovina
258. Tiscornia AC, Cayota A, Landoni AI, et al (2004) Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403169>

12 ANEXO I. MATERIAL SUPLEMENTARIO – MATERIALES Y MÉTODOS

12.1 SECUENCIA DE PRIMERS

12.1.1 PRIMERS PARA CLONAR GAG EN (FLK-VLB) EN PT350

1) pT350 (BiP-)gag FOR: 5'-cagtgcaactaaaggggggatccgatctcaatctcgag**atgggaaattcccctctataacccccgcg**-3'

2) pT350 (BiP-)gag sin strep tag REV: 5'-ccggccttatcgtcatcgtcttcaagggccct**ttagtttttgattgagggttgacagtc**-3'

En subrayado y gris se señala el sitio XhoI y en negrita se señala el codón de inicio de gag. * Originalmente en lugar del sitio XhoI estaba el BglII pero al hacer un análisis de formación de estructuras secundarias, se observó la posibilidad de formación de una horquilla que quizás complicaría el RF clonaje por tanto se decidió sacar dicho sitio y sustituirlo por el XhoI (ctcga). En amarillo se señala parte de la secuencia del plásmido pT350 y en verde se señala la secuencia de Gag. En negrita se señalan el codón de inicio (atg) y el codón stop (tta) de Gag. Las Tm correspondientes a cada primer son 72,6°C y 70,4°C, para el primer For y Rev, respectivamente.

12.1.2 PRIMERS PARA CLONAR EL FRAGMENTO TMCTD OPTIMIZADO

1) pT350EnvTMCTDopt FOR: 5'-ggactgacagcctgggtgcgagaccattcat**agtgctgagcctgttctgctgg**-3'

2) pT350EnvTMCTDopt REV: 5'-ccttatcgtcatcgtcttcaagggccctca**ggggcacgggcgaggttgatgtaatcgg**-3'

Los primers diseñados para clonar el fragmento TMCTD en los plásmidos EnvGEFm y EnvGE fueron los mismos. En amarillo se señala parte de la secuencia de pT350EnvGEFm y pT350EnvGE y en verde se señala la secuencia de TMCTD. En negrita se señalan el codón stop (tca) de Env. Las Tm correspondientes a cada primer son 73.2°C y 73.6°C, para el primer For y Rev, respectivamente.

12.1.3 PRIMERS PARA LA MUTAGÉNESIS DEL PÉPTIDO ISU

Secuencia nucleotídica del dominio ISU: en rojo se muestran las posiciones que se quieren mutar y en verde se muestran los cambios que se quieren realizar.

gcc cag aat **cg**c cgc gga ctg gac tgg ctg tat atc cgc ctg (nativo)

ggc gcc aat **gcc** cgc gga ctg gac tgg ctg tat atc cgc ctg (mutante)

1) Isumut4-For: 5'- CCTCCGTGGTG GGC GCC AAT GCC CGC GGA CTG GAC TGG -3'

2) Isumut4-Rev: 5'- CCAGTCCAGTCCGCGGGCATTGGCGCCACCACGGA GG -3'

1) Isumut1-For: 5'- CCTCCGTGGTGGGCCAGAATCGCCGCGGACTGGACTGG-3'

2) Isumut1-Rev: 5'- CCAGTCCAGTCCGCGGCGATTCTGGCCACCACGGAGG -3'

1) Isumut2-For: 5'- CCTCCGTGGTGGCCGCCAATCGCCGCGGACTGGACTGG -3'

2) Isumut2-Rev: 5'- CCAGTCCAGTCCGCGGCGATTGGCGGCCACCACGGAGG -3'

1) Isumut3-For: 5'- CCTCCGTGGTGGCCAGAATGCCCGGACTGGACTGG-3'

2) Isumut3-Rev: 5'- CCAGTCCAGTCCGCGGGCATTCTGGGCCACCACGGAGG -3'

12.1.4 SECUENCIA DE PRIMERS PARA PCR

Nombre	Secuencia de primer (5' - 3')	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Referencia
VLB-env-3	CCCACAAGGGCGGGCGCCGGTTT	69.8	563	[256]
VLB-env-4	GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG	68.9	563	[256]
P24-BamHI-FOR	GTGGATCCTTGCCAATCATATCTGAAGGG	60.6	645	[257]
P24-BamHI-REV	TGGCTAGCTTGCCAATCATATCTGAAGGG	61.8	645	[257]
GADP-F	CTGAGAACGGGAAGCTTGTC	55.7	400	[258]
GADP-R	CCTGCTCACCACCTTCTTG	56	400	[258]

13 ANEXO II. MATERIAL SUPLEMENTARIO – RESULTADOS

13.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS. CONFIRMACIÓN DE SECUENCIA.

A continuación, se muestra el alineamiento obtenido con las secuencias obtenidas para cada construcción.

1) pT350VLBGag: Para el alineamiento se utilizó la secuencia teórica de pT350 Gag con stop. Azul: sitio de restricción XhoI; amarillo: 1^{er} codón de Gag; verde subrayado: codón stop de Gag; rojo: sitio de restricción Bsp120I

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60
pT350 Gag con stop  ATCTCGAGAT GGGAAATTCC CCCTCCTATA ACCCCCCCGC TGGTATCTCC CCCTCAGACT
EXP00715-coll-MTFor ATCTCGAGAT GGGAAATTCC CCCTCCTATA ACCCCCCCGC TGGTATCTCC CCCTCAGACT
EXP00715-coll-BGHRev -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      70      80      90     100     110     120
pT350 Gag con stop  GGCTCAACCT TCTGCAAAGC GCGCAAAGGC TCAATCCGCG ACCCTCTCCC AGCGATTTTA
EXP00715-coll-MTFor GGCTCAACCT TCTGCAAAGC GCGCAAAGGC TCAATCCGCG ACCCTCTCCC AGCGATTTTA
EXP00715-coll-BGHRev -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     130     140     150     160     170     180
pT350 Gag con stop  CCGATTTAAA GAATTACATC CATTGGTTTC ATAAGACCCA GAAAAAACCA TGGACTTTCA
EXP00715-coll-MTFor CCGATTTAAA GAATTACATC CATTGGTTTC ATAAGACCCA GAAAAAACCA TGGACTTTCA
EXP00715-coll-BGHRev -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     190     200     210     220     230     240
pT350 Gag con stop  CTTCTGGTGG CCCCACTCA TGTCCACCCG GGAGATTCGG CCGGGTTCCC CTTGTCTTGG
EXP00715-coll-MTFor CTTCTGGTGG CCCCACTCA TGTCCACCCG GGAGATTCGG CCGGGTTCCC CTTGTCTTGG
EXP00715-coll-BGHRev -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     250     260     270     280     290     300
pT350 Gag con stop  CCACCCATAA CGAAGTGCTC TCAAACGATG GGGGCGCCCC GGGTGCATCG GCCCCAGAAG
EXP00715-coll-MTFor CCACCCATAA CGAAGTGCTC TCAAACGATG GGGGCGCCCC GGGTGCATCG GCCCCAGAAG
EXP00715-coll-BGHRev -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350     360
pT350 Gag con stop  AACAAACCCC CCCTTATGAC CCCCCGCGG TTTTGCCAAT CATATCTGAA GGGAAATCGCA
EXP00715-coll-MTFor AACAAACCCC CCCTTATGAC CCCCCGCGG TTTTGCCAAT CATATCTGAA GGGAAATCGCA
EXP00715-coll-BGHRev -----CCTTATGAC CCCCCGCGG TTTTGCCAAT CATATCTGAA GGGAAATCGCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     370     380     390     400     410     420
pT350 Gag con stop  ACCGCCATCG TGCTTGGGCA CTCCGAGAAT TACAAGATAT CAAAAAGGAA ATTGAAAATA
EXP00715-coll-MTFor ACCGCCATCG TGCTTGGGCA CTCCGAGAAT TACAAGATAT CAAAAAGGAA ATTGAAAATA
EXP00715-coll-BGHRev -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     430     440     450     460     470     480
pT350 Gag con stop  AGGCACCGGG TTCGCAAGTA TGGATACAAA CACTACGACT TGCAATCCTG CAGGCCGACC
EXP00715-coll-MTFor AGGCACCGGG TTCGCAAGTA TGGATACAAA CACTACGACT TGCAATCCTG CAGGCCGACC
EXP00715-coll-BGHRev -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     490     500     510     520     530     540
pT350 Gag con stop  CTACTCCGGC TGACCTAGAA CAACTTTGCC AATATATTGC TTCCCGGTC GACCAAACGG
EXP00715-coll-MTFor CTACTCCGGC TGACCTAGAA CAACTTTGCC AATATATTGC TTCCCGGTC GACCAAACGG
EXP00715-coll-BGHRev -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      550      560      570      580      590      600
pT350 Gag con stop   CCCATATGAC CAGCCTAACG GCAGCAATAG CCGCCGCTGA AGCGGCCAAC ACCCTCCAGG
EXP00715-coll-MTFor CCCATATGAC CAGCCTAACG GCAGCAATAG CCGCCGCTGA AGCGGCCAAC ACCCTCCAGG
EXP00715-coll-BGHR   CCCATATGAC CAGCCTAACG GCAGCAATAG CCGCCGCTGA AGCGGCCAAC ACCCTCCAGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      610      620      630      640      650      660
pT350 Gag con stop   GTTTTAACCC CCAAAACGGG ACCCTAACCC AACAATCAGC TCAGCCCAAC GCCGGGGATC
EXP00715-coll-MTFor GTTTTAACCC CCAAAACGGG ACCCTAACCC AACAATCAGC TCAGCCCAAC GCCGGGGATC
EXP00715-coll-BGHR   GTTTTAACCC CCAAAACGGG ACCCTAACCC AACAATCAGC TCAGCCCAAC GCCGGGGATC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      670      680      690      700      710      720
pT350 Gag con stop   TTAGAAGTCA ATATCAAAAC CTCTGGCTTC AGGCCTGGAA AAATCTCCCT ACTCGTCCTT
EXP00715-coll-MTFor TTAGAAGTCA ATATCAAAAC CTCTGGCTTC AGGCCTGGAA AAATCTCCCT ACTCGTCCTT
EXP00715-coll-BGHR   TTAGAAGTCA ATATCAAAAC CTCTGGCTTC AGGCCTGGAA AAATCTCCCT ACTCGTCCTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      730      740      750      760      770      780
pT350 Gag con stop   CAGTACAACC TTGGTCCACC ATCGTCCAAG GCCCCGCCGA AAGCTATGTA GAGTTTGTC
EXP00715-coll-MTFor CAGTACAACC TTGGTCCACC ATCGTCCAAG GCCCCGCCGA AAGCTATGTA GAGTTTGTC
EXP00715-coll-BGHR   CAGTACAACC TTGGTCCACC ATCGTCCAAG GCCCCGCCGA AAGCTATGTA GAGTTTGTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      790      800      810      820      830      840
pT350 Gag con stop   ACCGGTTACA AATTTTCAAT GCTGACAACC TTCCCGACGG AGTCCCTAAG GAACCCATTA
EXP00715-coll-MTFor ACCGGTTACA AATTTTCAAT GCTGACAACC TTCCCGACGG AGTCCCTAAG GAACCCATTA
EXP00715-coll-BGHR   ACCGGTTACA AATTTTCAAT GCTGACAACC TTCCCGACGG AGTCCCTAAG GAACCCATTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      850      860      870      880      890      900
pT350 Gag con stop   TTGACTCCCT TAGTTATGCA AATGCTAACA AAGAGTGCCA GCAAATTTTG CAGGGGCGAG
EXP00715-coll-MTFor TTGACTCCCT TAGTTATGCA AATGCTAACA AAGAGTGCCA GCAAATTTTG CAGGGGCGAG
EXP00715-coll-BGHR   TTGACTCCCT TAGTTATGCA AATGCTAACA AAGAGTGCCA GCAAATTTTG CAGGGGCGAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      910      920      930      940      950      960
pT350 Gag con stop   GCCTAGTGGC CGCCCCGGTG GGGCAAAAAC TGCAGGCTTG CGCACATTGG GCCCCCAAGG
EXP00715-coll-MTFor GCCTAGTGGC CGCCCCGGTG GGGCAAAAAC TGCAGGCTTG CGCACATTGG GCCCCCAAGG
EXP00715-coll-BGHR   GCCTAGTGGC CGCCCCGGTG GGGCAAAAAC TGCAGGCTTG CGCACATTGG GCCCCCAAGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      970      980      990      1000     1010     1020
pT350 Gag con stop   TGAACAGCC  TGCAGTTCTC GTCCACACCC CAGGGCCCAA GATGCCCGGG CCTCGGCAAC
EXP00715-coll-MTFor TGAACAGCC  TGCAGTTCTC GTCCACACCC CAGGGCCCAA GATGCCCGGG CCTCGGCAAC
EXP00715-coll-BGHR   TGAACAGCC  TGCAGTTCTC GTCCACACCC CAGGGCCCAA GATGCCCGGG CCTCGGCAAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1030     1040     1050     1060     1070     1080
pT350 Gag con stop   CGGCCCCCAA AAGGCCTCCC CCAGGACCAT GCTATCGATG CCTCAAAGAA GGCCATTGGG
EXP00715-coll-MTFor CGGCCCCCAA AAGGCCTCCC CCAGGACCAT GCTATCGATG CCTCAAAGAA GGCCATTGGG
EXP00715-coll-BGHR   CGGCCCCCAA AAGGCCTCCC CCAGGACCAT GCTATCGATG CCTCAAAGAA GGCCATTGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1090     1100     1110     1120     1130     1140
pT350 Gag con stop   CCCGGGATTG TCCTACCAAG GCCACCGGCC CCCCTCCGGG ACCTTGCCCC ATATGTAAAG
EXP00715-coll-MTFor CCCGGGATTG TCCTACCAAG GCCACCGGCC CCCCTCCGGG ACCTTGCCCC ATATGTAAAG
EXP00715-coll-BGHR   CCCGGGATTG TCCTACCAAG GCCACCGGCC CCCCTCCGGG ACCTTGCCCC ATATGTAAAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1150     1160     1170     1180     1190
pT350 Gag con stop   ATCCTTCCCA TTGGAACAGA GACTGTCCAA CCCTCAAATC AAAAAACTAA -----
EXP00715-coll-MTFor ATCCTTCCCA TTGGAACAGA GACTGTCCAA CCCTCAAATC AAAAAACTAA GGGC
EXP00715-coll-BGHR   ATCCTTCCCA TTGGAACAGA GACTGTCCAA CCCTCAAATC AAAAAACTAA GGGC

```

2) pT350VLBEnv: Para el alineamiento se utilizó la secuencia teórica de pT350VLBEnv. Fucsia: codón de inicio de la secuencia BIP; Azul: sitio de restricción BgIII; amarillo: 1er codón de Env optimizada; verde: fragmento TMCTD y en subrayado el codón stop; rojo: sitio de restricción Bsp120I

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60
pT350 EnvGETC Teór CAATATGAAG TTATGCATAT TACTGGCCGT CGTGGCCTTT GTTGGCCTCT CGCTCGGGAG
VLP1713-t2-MFFor CAATATGAAG TTATGCATAT TACTGGCCGT CGTGGCCTTT GTTGGCCTCT CGCTCGGGAG
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      70      80      90     100     110     120
pT350 EnvGETC Teór ATCTACGTGG CGCTGCTCGC TGTCGCTGGG AAATCAGCAG TGGATGACCG CCTACAACCA
VLP1713-t2-MFFor ATCTACGTGG CGCTGCTCGC TGTCGCTGGG AAATCAGCAG TGGATGACCG CCTACAACCA
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     130     140     150     160     170     180
pT350 EnvGETC Teór GGAGGCCAAG TTCAGTATTA GTATTGACCA GATCCTGGAG GCCCACAACC AGAGTCCGTT
VLP1713-t2-MFFor GGAGGCCAAG TTCAGTATTA GTATTGACCA GATCCTGGAG GCCCACAACC AGAGTCCGTT
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     190     200     210     220     230     240
pT350 EnvGETC Teór CTGCGCCAAG AGCCACAGCT ACACCCCTGGA TTCGGTGAAT GGCTACCCCA AGATTTATTG
VLP1713-t2-MFFor CTGCGCCAAG AGCCACAGCT ACACCCCTGGA TTCGGTGAAT GGCTACCCCA AGATTTATTG
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     250     260     270     280     290     300
pT350 EnvGETC Teór GCCACCACCA CAGGGACGCC GCCGCTTCGG AGCCCGCGCC ATGGTGACGT ACGACTGCGA
VLP1713-t2-MFFor GCCACCACCA CAGGGACGCC GCCGCTTCGG AGCCCGCGCC ATGGTGACGT ACGACTGCGA
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350     360
pT350 EnvGETC Teór GCCACGCTGC CCATATGTGG GAGCCGATCG CTTTGACTGC CCACACTGGG ATAACGCCTC
VLP1713-t2-MFFor GCCACGCTGC CCATATGTGG GAGCCGATCG CTTTGACTGC CCACACTGGG ATAACGCCTC
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     370     380     390     400     410     420
pT350 EnvGETC Teór CCAGGCCGAC CAGGGATCGT TCTACGTGAA TCATCAGATC CTGTTTCTGC ACCTGAAGCA
VLP1713-t2-MFFor CCAGGCCGAC CAGGGATCGT TCTACGTGAA TCATCAGATC CTGTTTCTGC ACCTGAAGCA
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     430     440     450     460     470     480
pT350 EnvGETC Teór GTGCCATGGC ATCTTCACAC TGACCTGGGA GATTTGGGGA TATGATCCAC TGATCACCTT
VLP1713-t2-MFFor GTGCCATGGC ATCTTCACAC TGACCTGGGA GATTTGGGGA TATGATCCAC TGATCACCTT
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     490     500     510     520     530     540
pT350 EnvGETC Teór CAGTCTGCAT AAGATTCCCG ATCCCCCGCA GCCGGACTTT CCACAGCTGA ACAGCGATTG
VLP1713-t2-MFFor CAGTCTGCAT AAGATTCCCG ATCCCCCGCA GCCGGACTTT CCACAGCTGA ACAGCGATTG
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     550     560     570     580     590     600
pT350 EnvGETC Teór GGTGCCAAGT GTGCGCAGCT GGGCTCTGCT GCTGAATCAG ACCGCCCGCG CCTTTCCAGA
VLP1713-t2-MFFor GGTGCCAAGT GTGCGCAGCT GGGCTCTGCT GCTGAATCAG ACCGCCCGCG CCTTTCCAGA
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     610     620     630     640     650     660
pT350 EnvGETC Teór CTGCGCCATC TGCTGGGAGC CAAGCCCACC ATGGGCTCCC GAGATCCTGG TGTACAACAA
VLP1713-t2-MFFor CTGCGCCATC TGCTGGGAGC CAAGCCCACC ATGGGCTCCC GAGATCCTGG TGTACAACAA
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     670     680     690     700     710     720
pT350 EnvGETC Teór GACGATTAGC TCCAGCGGCC CCGGACTGGC CCTGCCAGAC GCCCAGATTT TCTGGGTGAA
VLP1713-t2-MFFor GACGATTAGC TCCAGCGGCC CCGGACTGGC CCTGCCAGAC GCCCAGATTT TCTGGGTGAA
VLP1713-t2-BGHRv -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     730     740     750     760     770     780
pT350 EnvGETC Teór CACAAGTAGC TTTAATACCA CGCAGGGCTG GCACCATCCA AGTCAGCGCC TGCTGTTCAA

```



```

      ....|....| ....|....| ..
                1510      1520
pT350 EnvGETC Teór GCGCCCGTGC CCCTGA---- --
VLP1713-t2-MTFor -----
VLP1713-t2-BGHRv GCGCCCGTGC CCCTGAGGGC CC

```

3) pT350EnvFm: Para el alineamiento se utilizó la secuencia teórica de pT350 EnvGETCFm. Fucsia: codón de inicio de la secuencia BIP; Azul: sitio de restricción BglII; amarillo: 1er codón de Env optimizada; violeta: sitio furina mutado; verde: fragmento TMCTD y en subrayado el codón stop; rojo: sitio de restricción Bsp120I

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                10      20      30      40      50      60
pT350 EnvGETCFm Teó ATGAAGTTAT GCATATTACT GGCCGTCGTG GCCTTTGTTG GCCTCTCGCT CGGGAGATCT
EXP00415-col4-MTFor ATGAAGTTAT GCATATTACT GGCCGTCGTG GCCTTTGTTG GCCTCTCGCT CGGGAGATCT
EXP00415-col4-BGHRv -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                70      80      90      100     110     120
pT350 EnvGETCFm Teó ACGTGGCGCT GCTCGCTGTC GCTGGGAAAT CAGCAGTGGG TGACCGCCTA CAACCAGGAG
EXP00415-col4-MTFor ACGTGGCGCT GCTCGCTGTC GCTGGGAAAT CAGCAGTGGG TGACCGCCTA CAACCAGGAG
EXP00415-col4-BGHRv -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                130     140     150     160     170     180
pT350 EnvGETCFm Teó GCCAAGTTCA GTATTAGTAT TGACCAGATC CTGGAGGCC ACAACCAGAG TCCGTTCTGC
EXP00415-col4-MTFor GCCAAGTTCA GTATTAGTAT TGACCAGATC CTGGAGGCC ACAACCAGAG TCCGTTCTGC
EXP00415-col4-BGHRv -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                190     200     210     220     230     240
pT350 EnvGETCFm Teó GCCAAGAGCC CACGCTACAC CCTGGATTTC GTGAATGGCT ACCCAAGAT TTATTGGCCA
EXP00415-col4-MTFor GCCAAGAGCC CACGCTACAC CCTGGATTTC GTGAATGGCT ACCCAAGAT TTATTGGCCA
EXP00415-col4-BGHRv -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                250     260     270     280     290     300
pT350 EnvGETCFm Teó CCACCACAGG GACGCCGCCG CTTCCGAGCC CGCGCCATGG TGACGTACGA CTGCGAGCCA
EXP00415-col4-MTFor CCACCACAGG GACGCCGCCG CTTCCGAGCC CGCGCCATGG TGACGTACGA CTGCGAGCCA
EXP00415-col4-BGHRv -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                310     320     330     340     350     360
pT350 EnvGETCFm Teó CGCTGCCCAT ATGTGGGAGC CGATCGCTTT GACTGCCAC ACTGGGATAA CGCCTCCCAG
EXP00415-col4-MTFor CGCTGCCCAT ATGTGGGAGC CGATCGCTTT GACTGCCAC ACTGGGATAA CGCCTCCCAG
EXP00415-col4-BGHRv -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                370     380     390     400     410     420
pT350 EnvGETCFm Teó GCCGACCAGG GATCGTTCTA CGTGAATCAT CAGATCCTGT TTCTGCACCT GAAGCAGTGC
EXP00415-col4-MTFor GCCGACCAGG GATCGTTCTA CGTGAATCAT CAGATCCTGT TTCTGCACCT GAAGCAGTGC
EXP00415-col4-BGHRv -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                430     440     450     460     470     480
pT350 EnvGETCFm Teó CATGGCATCT TCACACTGAC CTGGGAGATT TGGGGATATG ATCCACTGAT CACCTTCAGT
EXP00415-col4-MTFor CATGGCATCT TCACACTGAC CTGGGAGATT TGGGGATATG ATCCACTGAT CACCTTCAGT
EXP00415-col4-BGHRv -----

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                490     500     510     520     530     540
pT350 EnvGETCFm Teó CTGCATAAGA TTCCCGATCC CCCGCAGCCG GACTTTCCAC AGCTGAACAG CGATTGGGTG
EXP00415-col4-MTFor CTGCATAAGA TTCCCGATCC CCCGCAGCCG GACTTTCCAC AGCTGAACAG CGATTGGGTG
EXP00415-col4-BGHRv -----GA TTCCCGATCC CCCGCAGCCG GACTTTCCAC AGCTGAACAG CGATTGGGTG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                550     560     570     580     590     600
pT350 EnvGETCFm Teó CCAAGTGTGC GCAGCTGGGC TCTGCTGCTG AATCAGACCG CCCGCGCCTT TCCAGACTGC
EXP00415-col4-MTFor CCAAGTGTGC GCAGCTGGGC TCTGCTGCTG AATCAGACCG CCCGCGCCTT TCCAGACTGC

```

EXP00415-col4-BGHRé CCAAGTGTGC GCAGCTGGGC TCTGCTGCTG AATCAGACCG CCCGCGCCTT TCCAGACTGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
610 620 630 640 650 660
pT350 EnvGETCFm Teó GCCATCTGCT GGGAGCCAAG CCCACCATGG GCTCCCAGAG TCCTGGTGTG CAACAAGACG
EXP00415-col4-MTFFor GCCATCTGCT GGGAGCCAAG CCCACCATGG GCTCCCAGAG TCCTGGTGTG CAACAAGACG
EXP00415-col4-BGHRé GCCATCTGCT GGGAGCCAAG CCCACCATGG GCTCCCAGAG TCCTGGTGTG CAACAAGACG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
670 680 690 700 710 720
pT350 EnvGETCFm Teó ATTAGCTCCA GCGGCCCGG ACTGGCCCTG CCAGACGCC AGATTTTCTG GGTGAACACA
EXP00415-col4-MTFFor ATTAGCTCCA GCGGCCCGG ACTGGCCCTG CCAGACGCC AGATTTTCTG GGTGAACACA
EXP00415-col4-BGHRé ATTAGCTCCA GCGGCCCGG ACTGGCCCTG CCAGACGCC AGATTTTCTG GGTGAACACA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
730 740 750 760 770 780
pT350 EnvGETCFm Teó AGTAGCTTTA ATACCACGCA GGGCTGGCAC CATCCAAGTC AGCGCCTGCT GTTCAACGTG
EXP00415-col4-MTFFor AGTAGCTTTA ATACCACGCA GGGCTGGCAC CATCCAAGTC AGCGCCTGCT GTTCAACGTG
EXP00415-col4-BGHRé AGTAGCTTTA ATACCACGCA GGGCTGGCAC CATCCAAGTC AGCGCCTGCT GTTCAACGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
790 800 810 820 830 840
pT350 EnvGETCFm Teó AGCCAGGGAA ATGCCCTGCT GCTGCCGCCA ATCTCCCTGG TGAACCTGTC GACCGCCTCC
EXP00415-col4-MTFFor AGCCAGGGAA ATGCCCTGCT GCTGCCGCCA ATCTCCCTGG TGAACCTGTC GACCGCCTCC
EXP00415-col4-BGHRé AGCCAGGGAA ATGCCCTGCT GCTGCCGCCA ATCTCCCTGG TGAACCTGTC GACCGCCTCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
850 860 870 880 890 900
pT350 EnvGETCFm Teó TCGGCCCCAC CAACGCGCGT GAATAATTCC CCCGTGGCCG CCCTGACACT GGGCCTGGCC
EXP00415-col4-MTFFor TCGGCCCCAC CAACGCGCGT **GAATAAT**TCC CCCGTGGCCG CCCTGACACT GGGCCTGGCC
EXP00415-col4-BGHRé TCGGCCCCAC CAACGCGCGT **GAATAAT**TCC CCCGTGGCCG CCCTGACACT GGGCCTGGCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
910 920 930 940 950 960
pT350 EnvGETCFm Teó CTGTGGTGG GCCTGACCGG AATCAATGTG GCCGTGTCCG CCCTGTGCGA CCAGCGCCTG
EXP00415-col4-MTFFor CTGTGGTGG GCCTGACCGG AATCAATGTG GCCGTGTCCG CCCTGTGCGA CCAGCGCCTG
EXP00415-col4-BGHRé CTGTGGTGG GCCTGACCGG AATCAATGTG GCCGTGTCCG CCCTGTGCGA CCAGCGCCTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
970 980 990 1000 1010 1020
pT350 EnvGETCFm Teó ACCAGCCTGA TTCATGTGCT GGAGCAGGAT CAGCAGCGCC TGATCACGGC CATTAAACCAG
EXP00415-col4-MTFFor ACCAGCCTGA TTCATGTGCT GGAGCAGGAT CAGCAGCGCC TGATCACGGC CATTAAACCAG
EXP00415-col4-BGHRé ACCAGCCTGA TTCATGTGCT GGAGCAGGAT CAGCAGCGCC TGATCACGGC CATTAAACCAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1030 1040 1050 1060 1070 1080
pT350 EnvGETCFm Teó ACACACTACA ACCTGCTGAA TGTGGCCTCC GTGGTGGCCC AGAATCGCCG CGGACTGGAC
EXP00415-col4-MTFFor ACACACTACA ACCTGCTGAA TGTGGCCTCC GTGGTGGCCC AGAATCGCCG CGGACTGGAC
EXP00415-col4-BGHRé ACACACTACA ACCTGCTGAA TGTGGCCTCC GTGGTGGCCC AGAATCGCCG CGGACTGGAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1090 1100 1110 1120 1130 1140
pT350 EnvGETCFm Teó TGGGTGTATA TCCGCCTGGG ATTCCAGTCC CTGTGCCCAA CAATCAACGA GCCCTGTGTC
EXP00415-col4-MTFFor TGGGTGTATA TCCGCCTGGG ATTCCAGTCC CTGTGCCCAA CAATCAACGA GCCCTGTGTC
EXP00415-col4-BGHRé TGGGTGTATA TCCGCCTGGG ATTCCAGTCC CTGTGCCCAA CAATCAACGA GCCCTGTGTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1150 1160 1170 1180 1190 1200
pT350 EnvGETCFm Teó TTTCTGCGCA TTCAGAATGA TTCGATCATT GCCTGGGCG ACCTGCAGCC ACTGAGTCAG
EXP00415-col4-MTFFor TTTCTGCGCA TTCAGAATGA TTCGATCATT GCCTGGGCG ACCTGCAGCC ACTGAGTCAG
EXP00415-col4-BGHRé TTTCTGCGCA TTCAGAATGA TTCGATCATT GCCTGGGCG ACCTGCAGCC ACTGAGTCAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1210 1220 1230 1240 1250 1260
pT350 EnvGETCFm Teó CGCGTGAGCA CGGATTGGCA GTGGCCGTGG AACTGGGACC TGGGACTGAC AGCCTGGGTG
EXP00415-col4-MTFFor CGCGTGAGCA CGGATTGGCA GTGGCCGTGG AACTGGGACC TGGGACTGAC AGCCTGGGTG
EXP00415-col4-BGHRé CGCGTGAGCA CGGATTGGCA GTGGCCGTGG AACTGGGACC TGGGACTGAC AGCCTGGGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1270 1280 1290 1300 1310 1320
pT350 EnvGETCFm Teó CGCGAGACCA TTCATAGTGT GCTGAGCCTG TTTCTGCTGG CCCTGTTTCT GCTGTTCTTG
EXP00415-col4-MTFFor CGCGAGACCA TTCATAGTGT GCTGAGCCTG TTTCTGCTGG CCCTGTTTCT GCTGTTCTTG
EXP00415-col4-BGHRé CGCGAGACCA TTCATAGTGT GCTGAGCCTG TTTCTGCTGG CCCTGTTTCT GCTGTTCTTG

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
pT350 EnvGETCFm Teó GCCCCGTGCC TGATTAAGTG CCTGACCTCC CGCCTGCTGA AGCTGCTGCG CCAGGCCCA
EXP00415-col4-MTFor .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EXP00415-col4-BGHRé GCCCCGTGCC TGATTAAGTG CCTGACCTCC CGCCTGCTGA AGCTGCTGCG CCAGGCCCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
pT350 EnvGETCFm Teó CACTTCCCAG AGATCAGCCT GACCCCAAG CCGGATTCCG ACTACCAGGC CCTGCTGCCG
EXP00415-col4-MTFor .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EXP00415-col4-BGHRé CACTTCCCAG AGATCAGCCT GACCCCAAG CCGGATTCCG ACTACCAGGC CCTGCTGCCG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1450      1460      1470      1480      1490      1500
pT350 EnvGETCFm Teó AGCGCCCAG AGATTTATTC CCATCTGAGC CCCGTGAAGC CCGATTACAT CAACCTGCGC
EXP00415-col4-MTFor .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EXP00415-col4-BGHRé AGCGCCCAG AGATTTATTC CCATCTGAGC CCCGTGAAGC CCGATTACAT CAACCTGCGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1510
pT350 EnvGETCFm Teó CCGTGCCCT GA-----
EXP00415-col4-MTFor .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EXP00415-col4-BGHRé CCGTGCCCT GAGGGCCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

4) pT350EnvGEFmIm3: Fucsia: codón de inicio de la secuencia BIP; Azul: sitio de restricción BgIII; amarillo: 1er codón de Env optimizada; violeta: sitio furina mutado; resaltado en amarillo: los tres codones mutados, en azul: de restricción Bsp120I.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60
pT350 con EnvGE Teór AATATGAAGT TATGCATATT ACTGGCCGTC GTGGCCTTTG TTGGCCTCTC GCTCGGGAGA
EnvGE Teórica -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EXP00915t4-4_MT-For AaTatgaagt TATGCATATT ACTGGCCGTC GTGGCCTTTG TTGGCCTCTC GCTCGGGAGA
EXP00915t4-4_BGHRé -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      70      80      90      100     110     120
pT350 con EnvGE Teór TCTACGTGGC GCTGCTCGCT GTCGCTGGGA AATCAGCAGT GGATGACCGC CTACAACCAG
EnvGE Teórica ---ACGTGGC GCTGCTCGCT GTCGCTGGGA AATCAGCAGT GGATGACCGC CTACAACCAG
EXP00915t4-4_MT-For TCTACGTGGC GCTGCTCGCT GTCGCTGGGA AATCAGCAGT GGATGACCGC CTACAACCAG
EXP00915t4-4_BGHRé -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      130     140     150     160     170     180
pT350 con EnvGE Teór GAGGCCAAGT TCAGTATTAG TATTGACCAG ATCCTGGAGG CCCACAACCA GAGTCCGTTC
EnvGE Teórica GAGGCCAAGT TCAGTATTAG TATTGACCAG ATCCTGGAGG CCCACAACCA GAGTCCGTTC
EXP00915t4-4_MT-For GAGGCCAAGT TCAGTATTAG TATTGACCAG ATCCTGGAGG CCCACAACCA GAGTCCGTTC
EXP00915t4-4_BGHRé -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      190     200     210     220     230     240
pT350 con EnvGE Teór TGCGCCAAGA GCCCAGCCTA CACCCTGGAT TCGGTGAATG GCTACCCCAA GATTTATTGG
EnvGE Teórica TGCGCCAAGA GCCCAGCCTA CACCCTGGAT TCGGTGAATG GCTACCCCAA GATTTATTGG
EXP00915t4-4_MT-For TGCGCCAAGA GCCCAGCCTA CACCCTGGAT TCGGTGAATG GCTACCCCAA GATTTATTGG
EXP00915t4-4_BGHRé -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      250     260     270     280     290     300
pT350 con EnvGE Teór CCACCACCAC AGGGACGCCG CCGCTTCGGA GCCCGGCCA TGGTGACGTA CGACTGCGAG
EnvGE Teórica CCACCACCAC AGGGACGCCG CCGCTTCGGA GCCCGGCCA TGGTGACGTA CGACTGCGAG
EXP00915t4-4_MT-For CCACCACCAC AGGGACGCCG CCGCTTCGGA GCCCGGCCA TGGTGACGTA CGACTGCGAG
EXP00915t4-4_BGHRé CCaCaCCAC AGGGACGCCG CCGCTTCGGA GCCCGGCCA TGGTGACGTA CGACTGCGAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350     360

```

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

CCACGCTGCC CATATGTGGG AGCCGATCGC TTTGACTGCC CACACTGGGA TAACGCCTCC
 CCACGCTGCC CATATGTGGG AGCCGATCGC TTTGACTGCC CACACTGGGA TAACGCCTCC
 CCACGCTGCC CATATGTGGG AGCCGATCGC TTTGACTGCC CACACTGGGA TAACGCCTCC
 CCACGCTGCC CATATGTGGG AGCCGATCGC TTTGACTGCC CACACTGGGA TAACGCCTCC

.....||||||||
 370 380 390 400 410 420

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

CAGGCCGACC AGGGATCGTT CTACGTGAAT CATCAGATCC TGTTCCTGCA CCTGAAGCAG
 CAGGCCGACC AGGGATCGTT CTACGTGAAT CATCAGATCC TGTTCCTGCA CCTGAAGCAG
 CAGGCCGACC AGGGATCGTT CTACGTGAAT CATCAGATCC TGTTCCTGCA CCTGAAGCAG
 CAGGCCGACC AGGGATCGTT CTACGTGAAT CATCAGATCC TGTTCCTGCA CCTGAAGCAG

.....||||||||
 430 440 450 460 470 480

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

TGCCATGGCA TCTTCACACT GACCTGGGAG ATTTGGGGAT ATGATCCACT GATCACCTTC
 TGCCATGGCA TCTTCACACT GACCTGGGAG ATTTGGGGAT ATGATCCACT GATCACCTTC
 TGCCATGGCA TCTTCACACT GACCTGGGAG ATTTGGGGAT ATGATCCACT GATCACCTTC
 TGCCATGGCA TCTTCACACT GACCTGGGAG ATTTGGGGAT ATGATCCACT GATCACCTTC

.....||||||||
 490 500 510 520 530 540

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

AGTCTGCATA AGATTCCCAG TCCCCCGCAG CCGGACTTTC CACAGCTGAA CAGCGATTGG
 AGTCTGCATA AGATTCCCAG TCCCCCGCAG CCGGACTTTC CACAGCTGAA CAGCGATTGG
 AGTCTGCATA AGATTCCCAG TCCCCCGCAG CCGGACTTTC CACAGCTGAA CAGCGATTGG
 AGTCTGCATA AGATTCCCAG TCCCCCGCAG CCGGACTTTC CACAGCTGAA CAGCGATTGG

.....||||||||
 550 560 570 580 590 600

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

GTGCCAAGTG TGCGCAGCTG GGCTCTGCTG CTGAATCAGA CCGCCCAGCG CTTTCCAGAC
 GTGCCAAGTG TGCGCAGCTG GGCTCTGCTG CTGAATCAGA CCGCCCAGCG CTTTCCAGAC
 GTGCCAAGTG TGCGCAGCTG GGCTCTGCTG CTGAATCAGA CCGCCCAGCG CTTTCCAGAC
 GTGCCAAGTG TGCGCAGCTG GGCTCTGCTG CTGAATCAGA CCGCCCAGCG CTTTCCAGAC

.....||||||||
 610 620 630 640 650 660

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

TGGCCATCT GCTGGGAGCC AAGCCCACCA TGGGCTCCCG AGATCCTGGT GTACAACAAG
 TGGCCATCT GCTGGGAGCC AAGCCCACCA TGGGCTCCCG AGATCCTGGT GTACAACAAG
 TGGCCATCT GCTGGGAGCC AAGCCCACCA TGGGCTCCCG AGATCCTGGT GTACAACAAG
 TGGCCATCT GCTGGGAGCC AAGCCCACCA TGGGCTCCCG AGATCCTGGT GTACAACAAG

.....||||||||
 670 680 690 700 710 720

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

ACGATTAGCT CCAGCGGCCG CGGACTGGCC CTGCCAGACG CCCAGATTTT CTGGGTGAAC
 ACGATTAGCT CCAGCGGCCG CGGACTGGCC CTGCCAGACG CCCAGATTTT CTGGGTGAAC
 ACGATTAGCT CCAGCGGCCG CGGACTGGCC CTGCCAGACG CCCAGATTTT CTGGGTGAAC
 ACGATTAGCT CCAGCGGCCG CGGACTGGCC CTGCCAGACG CCCAGATTTT CTGGGTGAAC

.....||||||||
 730 740 750 760 770 780

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

ACAAGTAGCT TTAATACCAC GCAGGGCTGG CACCATCCAA GTCAGCGCCT GCTGTTCAAC
 ACAAGTAGCT TTAATACCAC GCAGGGCTGG CACCATCCAA GTCAGCGCCT GCTGTTCAAC
 ACAAGTAGCT TTAATACCAC GCAGGGCTGG CACCATCCAA GTCAGCGCCT GCTGTTCAAC
 ACAAGTAGCT TTAATACCAC GCAGGGCTGG CACCATCCAA GTCAGCGCCT GCTGTTCAAC

.....||||||||
 790 800 810 820 830 840

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

GTGAGCCAGG GAAATGCCCT GCTGTGCGG CCAATCTCCC TGGTGAACCT GTCGACCGCC
 GTGAGCCAGG GAAATGCCCT GCTGTGCGG CCAATCTCCC TGGTGAACCT GTCGACCGCC
 GTGAGCCAGG GAAATGCCCT GCTGTGCGG CCAATCTCCC TGGTGAACCT GTCGACCGCC
 GTGAGCCAGG GAAATGCCCT GCTGTGCGG CCAATCTCCC TGGTGAACCT GTCGACCGCC

.....||||||||
 850 860 870 880 890 900

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

TCCTCGGCC CACCAACGCG CGTGCGCCG TCCCCCGTGG CCGCCCTGAC ACTGGGCCTG
 TCCTCGGCC CACCAACGCG CGTGCGCCG TCCCCCGTGG CCGCCCTGAC ACTGGGCCTG
 TCCTCGGCC CACCAACGCG CGTGAATAAT TCCCCCGTGG CCGCCCTGAC ACTGGGCCTG
 TCCTCGGCC CACCAACGCG CGTGAATAAT TCCCCCGTGG CCGCCCTGAC ACTGGGCCTG

.....||||||||
 910 920 930 940 950 960

pT350 con EnvGE Teór
EnvGE Teórica
EXP00915t4-4_MT-For
EXP00915t4-4_BGHRev

GCCCTGTCGG TGGGCCTGAC CGGAATCAAT GTGGCCGTGT CCGCCCTGTC GCACCAGCGC
 GCCCTGTCGG TGGGCCTGAC CGGAATCAAT GTGGCCGTGT CCGCCCTGTC GCACCAGCGC
 GCCCTGTCGG TGGGCCTGAC CGGAATCAAT GTGGCCGTGT CCGCCCTGTC GCACCAGCGC
 GCCCTGTCGG TGGGCCTGAC CGGAATCAAT GTGGCCGTGT CCGCCCTGTC GCACCAGCGC

.....||||||||
 970 980 990 1000 1010 1020

```

pT350 con EnvGE Teór      CTGACCAGCC TGATTCATGT GCTGGAGCAG GATCAGCAGC GCCTGATCAC GGCCATTAAC
EnvGE Teórica             CTGACCAGCC TGATTCATGT GCTGGAGCAG GATCAGCAGC GCCTGATCAC GGCCATTAAC
EXP00915t4-4_MT-For      CTGACCAGCC TGATTCATGT GCTGGAGCAG GATCAGCAGC GCCTGATCAC GGCCATTAAC
EXP00915t4-4_BGHRev      CTGACCAGCC TGATTCATGT GCTGGAGCAG GATCAGCAGC GCCTGATCAC GGCCATTAAC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1030      1040      1050      1060      1070      1080
pT350 con EnvGE Teór      CAGACACACT ACAACCTGCT GAATGTGGCC TCCGTGGTGG CCCAGAATCG CCGCGGACTG
EnvGE Teórica             CAGACACACT ACAACCTGCT GAATGTGGCC TCCGTGGTGG CCCAGAATCG CCGCGGACTG
EXP00915t4-4_MT-For      CAGACACACT ACAACCTGCT GAATGTGGCC TCCGTGGTGG CCGCCAATGC CCGCGGACTG
EXP00915t4-4_BGHRev      CAGACACACT ACAACCTGCT GAATGTGGCC TCCGTGGTGG CCGCCAATGC CCGCGGACTG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1090      1100      1110      1120      1130      1140
pT350 con EnvGE Teór      GACTGGCTGT ATATCCGCCT GGGATTCCAG TCCCTGTGCC CAACAATCAA CGAGCCCTGC
EnvGE Teórica             GACTGGCTGT ATATCCGCCT GGGATTCCAG TCCCTGTGCC CAACAATCAA CGAGCCCTGC
EXP00915t4-4_MT-For      GACTGGCTGT ATATCCGCCT GGGATTCCAG TCCcTGTGCC cAACAATCAA CGAGCCcTGC
EXP00915t4-4_BGHRev      GACTGGCTGT ATATCCGCCT GGGATTCCAG TCCCTGTGCC CAACAATCAA CGAGCCCTGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1150      1160      1170      1180      1190      1200
pT350 con EnvGE Teór      TGCTTTCTGC GCATTCAGAA TGATTCGATC ATTTCGCCTGG GCGACCTGCA GCCACTGAGT
EnvGE Teórica             TGCTTTCTGC GCATTCAGAA TGATTCGATC ATTTCGCCTGG GCGACCTGCA GCCACTGAGT
EXP00915t4-4_MT-For      TGCTTtCTGC GCaTTcAGAA TGATtCGATC ATTTCGcCTGG GCGAcCTGCA GcCACTGAGT
EXP00915t4-4_BGHRev      TGCTTTCTGC GCATTCAGAA TGATTCGATC ATTTCGCCTGG GCGACCTGCA GCCACTGAGT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1210      1220      1230      1240      1250      1260
pT350 con EnvGE Teór      CAGCGCGTGA GCACGGATTG GCAGTGGCCG TGGAACTGGG ACCTGGGACT GACAGCCTGG
EnvGE Teórica             CAGCGCGTGA GCACGGATTG GCAGTGGCCG TGGAACTGGG ACCTGGGACT GACAGCCTGG
EXP00915t4-4_MT-For      CAGCGcGTGA GCaCGGATTG GCA-----
EXP00915t4-4_BGHRev      CAGCGCGTGA GCACGGATTG GCAGTGGCCG TGGAACTGGG ACCTGGGACT GACAGCCTGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1270      1280      1290      1300      1310      1320
pT350 con EnvGE Teór      GTGCGCGAGA CCATTTCATGG GCCCTTCGAA GACGATGACG ATAAGGCCGG TTGGAGTCAT
EnvGE Teórica             GTGCGCGAGA CCATTTCAT-- -----
EXP00915t4-4_MT-For      -----
EXP00915t4-4_BGHRev      GTGCGCGAGA CCATTTCATGG GCCCTTCGAA GACGATGACG ATAAGGCCGG TTGGAGTCAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
pT350 con EnvGE Teór      CCACAATTCG AGAAGGGCGG CGGCTCCGGA GGTGGATCAG GAGGTGGTTC CTGGTCACAC
EnvGE Teórica             -----
EXP00915t4-4_MT-For      -----
EXP00915t4-4_BGHRev      CCACAATTCG AGAAGGGCGG CGGCTCCGGA GGTGGATCAG GAGGTGGTTC CTGGTCACAC

      ....|..
pT350 con EnvGE Teór      CCTCAAT
EnvGE Teórica             -----
EXP00915t4-4_MT-For      -----
EXP00915t4-4_BGHRev      CCTCAAT

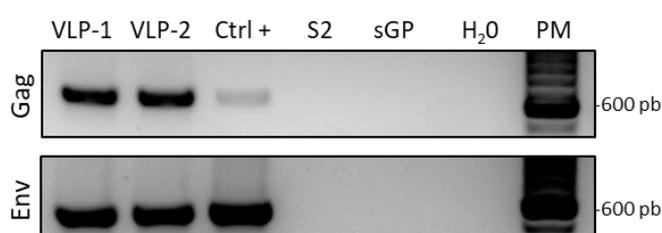
```

13.2 EXPRESIÓN, PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VLPS

13.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES PRODUCTORAS DE VLPS

13.2.1.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE CÉLULAS TRANSFECTADAS/PCR ENV Y GAG

A partir de 1 mL de cultivo de cada una de las líneas estables generadas, se realizó la extracción del ADN utilizando el kit Pure Link Genomic DNA mini kit (Invitrogen), según las recomendaciones del fabricante. El ADN extraído fue cuantificado por Nanodrop. Para la PCR el protocolo fue ajustado de acuerdo con las indicaciones del proveedor de la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen), así como las condiciones del ciclado de acuerdo a primers (Anexo I). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo una mezcla de: 1x Taq buffer 10X, 1.5 μ L MgCl₂ 50mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1.5 μ L de cada oligonucleótido, 0,25 μ L de Taq ADN polimerasa (50U/ μ L) y 50 ng de ADN. Las condiciones de la amplificación fueron: 94°C durante 2 min., 30 ciclos de 95°C durante 30 seg., 60 durante 30 seg., 72°C durante 1 min. y 72°C durante 4 min. Luego de la amplificación, 5 μ L del producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %. Los geles fueron preparados en buffer 1x TAE conteniendo 1 μ L de bromuro de etido. Los productos obtenidos se visualizaron bajo luz UV (AnexoII.Figura S 1).



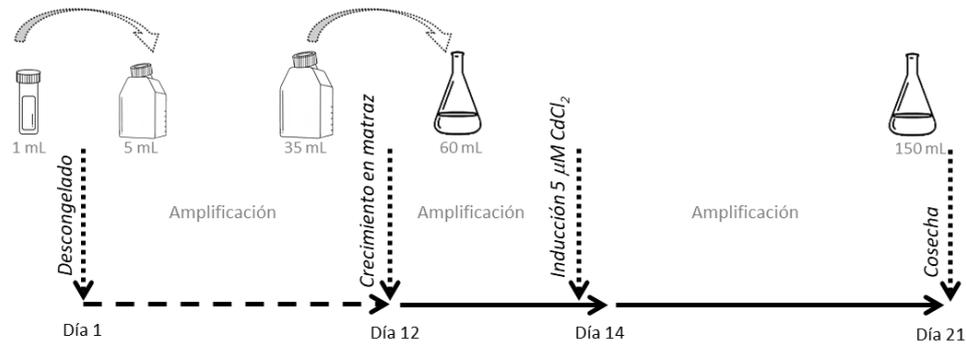
AnexoII.Figura S 1. Amplificación por PCR de los genes *gag* y *env* en las líneas estables generadas.

A) Gel de agarosa 1%. Se puede apreciar en los carriles 1 y 2 las bandas correspondientes a la amplificación parcial de los genes *env* (563 pb) y *gag* (645 pb) a partir del ADN genómico correspondiente a las líneas estables generadas que producen las VLP-1 y VLP-2. Carril 3: control positivo (ADN de la línea celular FLK persistentemente infectada con VLB), carriles 4-6: controles negativos. Carril 7: marcador de peso molecular 1kb de New England (PM).

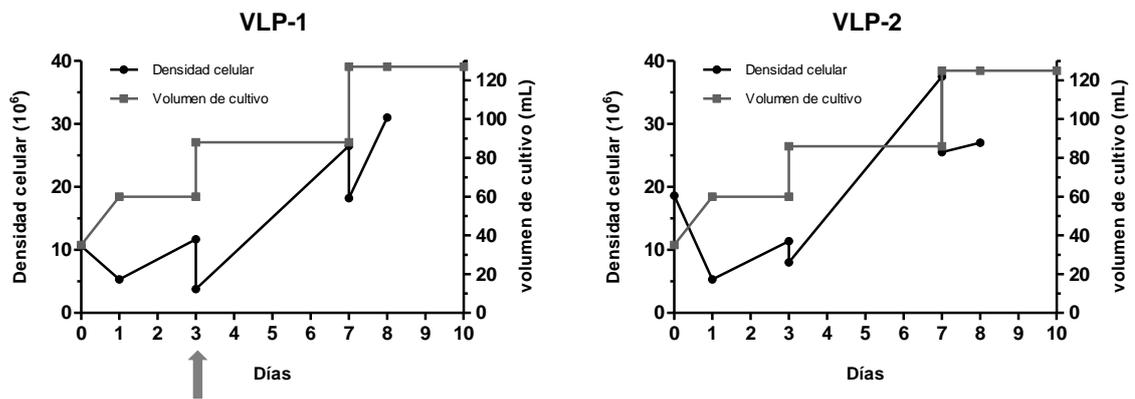
13.2.2 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VLPS

Para la producción de las VLPs, los cultivos celulares fueron expandidos para su crecimiento en matraces y con agitación.

A)

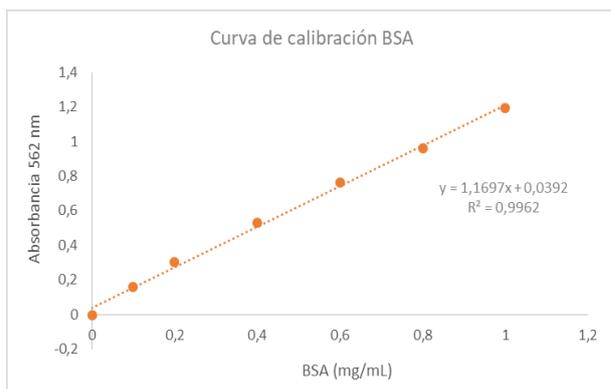


B)



AnexoII.Figura S 2.Expansión del cultivo de S2.

A) Esquema representativo del proceso de escalado del cultivo para la obtención de VLPs. B) Densidad celular y volumen del cultivo durante los 7 días del cultivo en matraz. La flecha indica el momento de la inducción



AnexoII.Figura S 3. Cuantificación de proteínas totales por BCA.

El sobrenadante (39 mL) de células inducidas durante 7 días, fue clarificado y filtrado, para luego ser ultracentrifugado en colchón de sacarosa. El pellet obtenido se resuspendió en 1,5 mL de PBS. La cantidad total de proteínas presente en el pellet se cuantificó por BCA. El rendimiento fue de 1,7 mg proteínas totales/L de cultivo.

Dilución	VLP-2	VLP-2	Promedio	Promedio-blanco
1	0,176	0,184	0,18	0,091
1/2	0,132	0,133	0,1325	0,0435
1/5	0,104	0,105	0,1045	0,0155
1/10	0,092	0,092	0,092	0,003
1/20	0,088	0,088	0,088	-0,001
1/50	0,086	0,087	0,0865	-0,0025

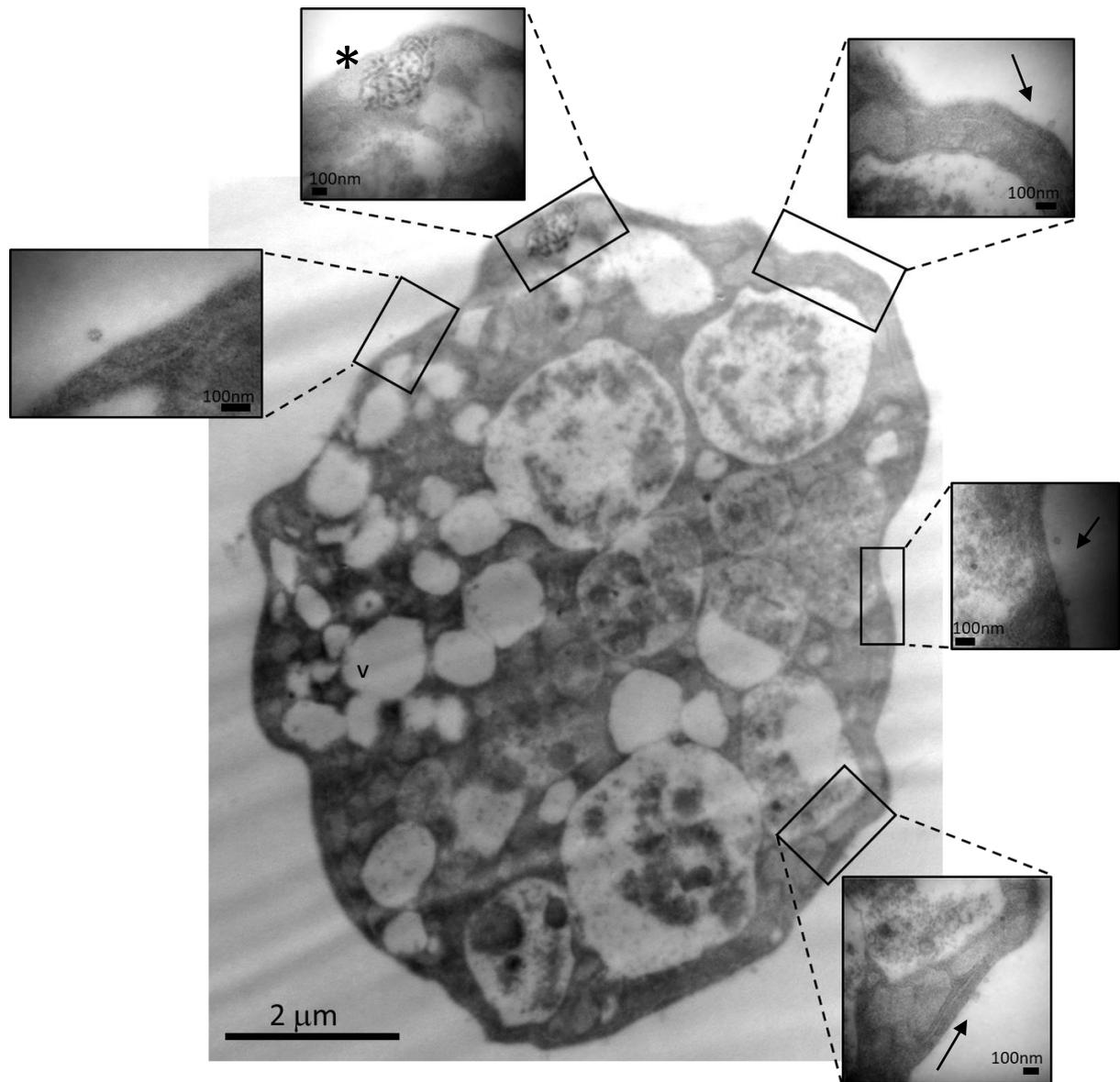
13.2.2.1 IDENTIFICACIÓN DE GAG Y ENVM POR ESPECTROMETRÍA DE MASA

La identificación de las proteínas Gag y Env por espectrometría de masa se hizo a partir de tres replicas.

AnexoII. Tabla S 1. Identificación de las proteínas Gag y EnvFm en tres replicas

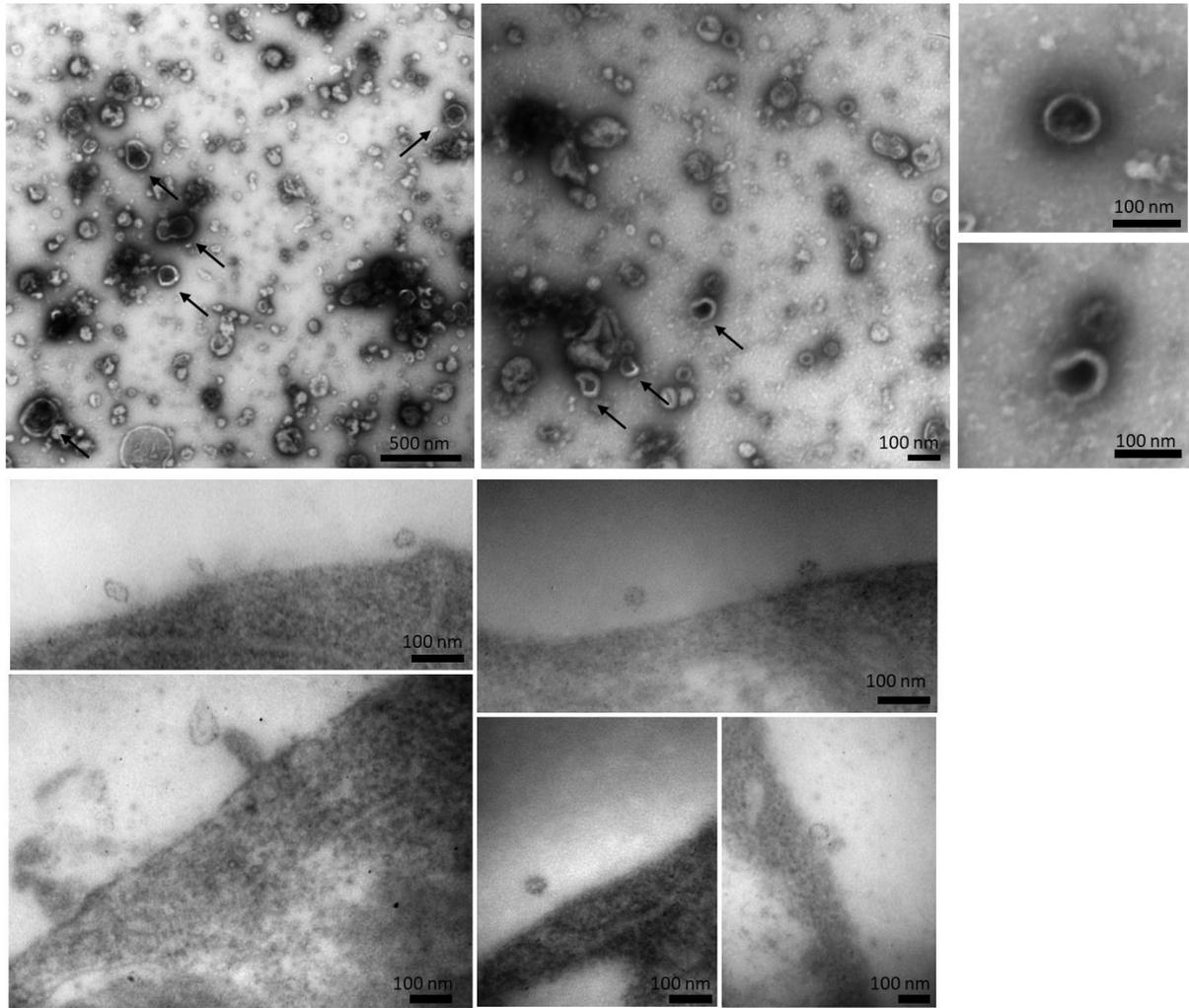
	Replicate 1				Replicate 2				Replicate 3			
	Sequence Count	Spectrum Count	Coverage	Protein Score	Sequence Count	Spectrum Count	Coverage	Protein Score	Sequence Count	Spectrum Count	Coverage	Protein Score
EnvFm	8	9	0,191	23,139	6	7	0,176	20,321	4	5	0,104	10,324
Gag	1	1	0,115	3,303	2	2	0,150	5,011	2	2	0,061	4,888
Replicate 1												
	Z	Measured MH ⁺	Theoretical MH ⁺	PPM	Primary Score	Peptide Sequence						
EnvFm	3	1191,665	1191,663	1,190	1,953	R.RGLDWLYR.L						
	3	2405,198	2404,193	0,520	3,984	K.IPDPPQPDFPQLNSDWWPSVR.S						
	2	1257,525	1257,524	0,653	2,291	R.AM(+15.994900)VTYDCEPR.C						
	2	2212,039	2212,035	1,784	3,881	R.LGFQSLCPTINEPCCFLLR.I						
	3	2213,038	2212,035	-0,164	3,970	R.LGFQSLCPTINEPCCFLLR.I						
	2	1256,616	1256,616	0,117	2,274	R.YTLDVNVGPK.I						
	3	1679,909	1679,908	1,066	3,122	R.LTSLIHVLEQDQQR.L						
	2	1035,562	1035,562	0,267	1,608	R.GLDWLYR.L						
Gag	2	1113,588	1113,584	3,288	1,367	K.IYWPPQGR.R						
	4	4563,342	4561,346	-2,265	2,833	R.VPLVLTATLNEVLSNDGGAPGASAPPEEQPPYDPPAVLPIISEGNR.N						
Replicate 2												
	Z	Measured MH ⁺	Theoretical MH ⁺	PPM	Primary Score	Peptide Sequence						
EnvFm	2	2405,189	2404,193	-3,027	3,256	K.IPDPPQPDFPQLNSDWWPSVR.S						
	3	2404,191	2404,193	-0,962	4,072	K.IPDPPQPDFPQLNSDWWPSVR.S						
	3	2305,127	2305,128	-0,560	4,232	K.FSISIDILEAHNQSFPCK.S						
	2	1257,524	1257,524	0,437	2,248	R.AM(+15.994900)VTYDCEPR.C						
	2	1256,615	1256,616	-0,465	1,863	R.YTLDVNVGPK.I						
	3	1679,907	1679,908	-0,321	3,234	R.LTSLIHVLEQDQQR.L						
	2	1113,583	1113,584	-1,012	1,417	K.IYWPPQGR.R						
	Gag	4	4564,328	4561,346	-6,101	2,662	R.VPLVLTATLNEVLSNDGGAPGASAPPEEQPPYDPPAVLPIISEGNR.N					
	4	1470,879	1470,879	-0,149	2,348	K.VKQPAVLVHTPGPK.M						
Replicate 3												
	Z	Measured MH ⁺	Theoretical MH ⁺	PPM	Primary Score	Peptide Sequence						
EnvFm	2	1113,582	1113,584	-1,851	1,392	K.IYWPPQGR.R						
	2	1113,586	1113,584	2,153	1,185	K.IYWPPQGR.R						
	2	1126,620	1126,621	-1,182	2,951	R.LGDLQPLSR.V						
	2	1257,521	1257,524	-2,160	1,878	R.AM(+15.994900)VTYDCEPR.C						
	3	2405,197	2404,193	0,292	2,918	K.IPDPPQPDFPQLNSDWWPSVR.S						
	Gag	2	939,561	939,562	-0,775	2,164	R.GLVAAPVGGQL.L					
	4	1470,879	1470,879	-0,345	2,724	K.VKQPAVLVHTPGPK.M						

13.2.2.2 MORFOLOGÍA DE LAS VLPS

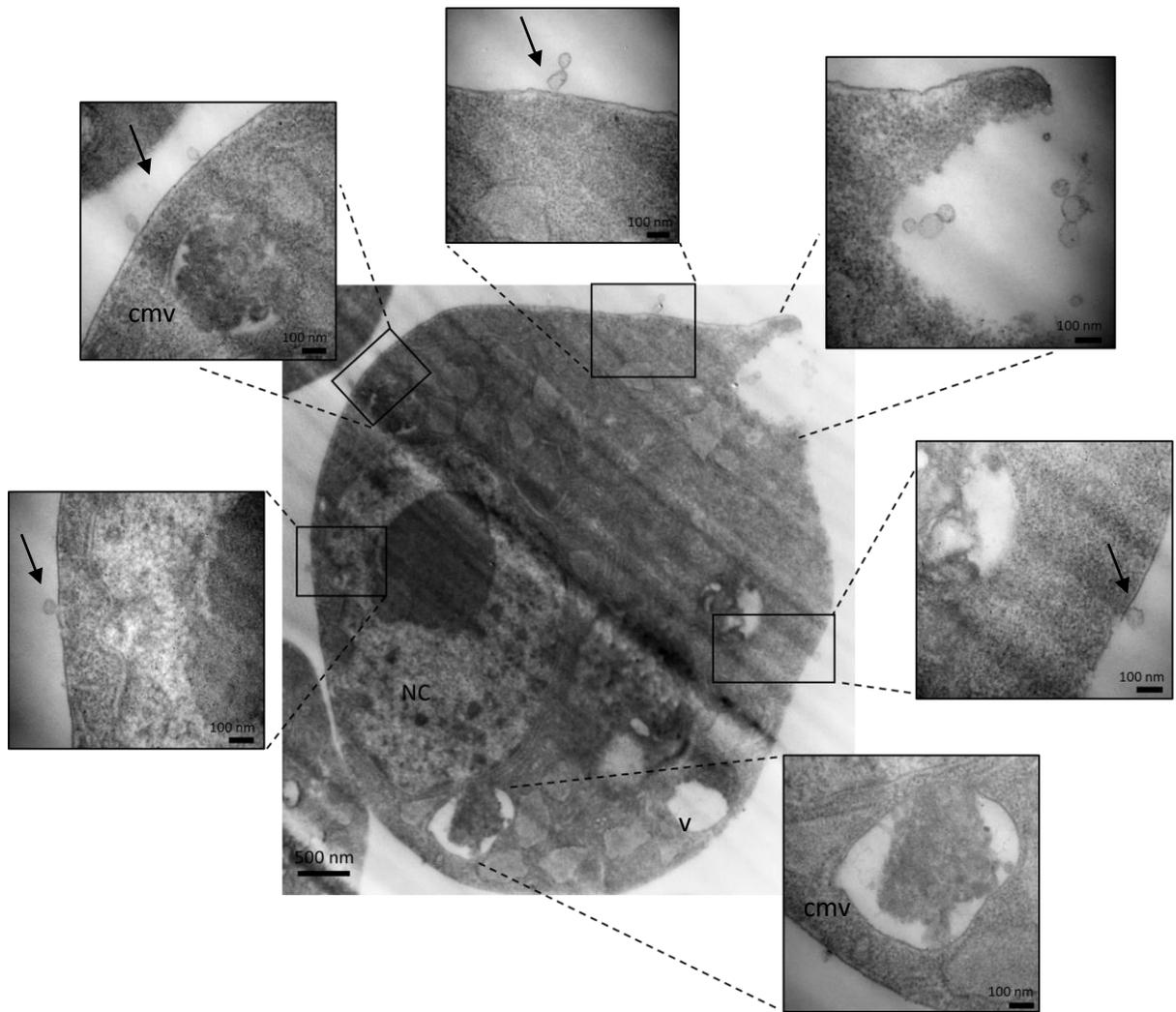


AnexoII.Figura S 4. Visualización de una célula S2 inducida productora de VLP-1 por MET.

Las células S2 productoras de VLP-1 fueron inducidas durante 7 días. Las células se centrifugaron y se fijaron con PFA al 10% en buffer fosfato y glutaraldeído. Se puede apreciar el núcleo (NC), cuerpos multi vesiculares presentes (cmv), vacuolas (v), vesículas y/o VLPs brotando (flecha). Se observan estructuras compatibles con tubulos. Estas estructuras fueron observadas en varias células del preparado.

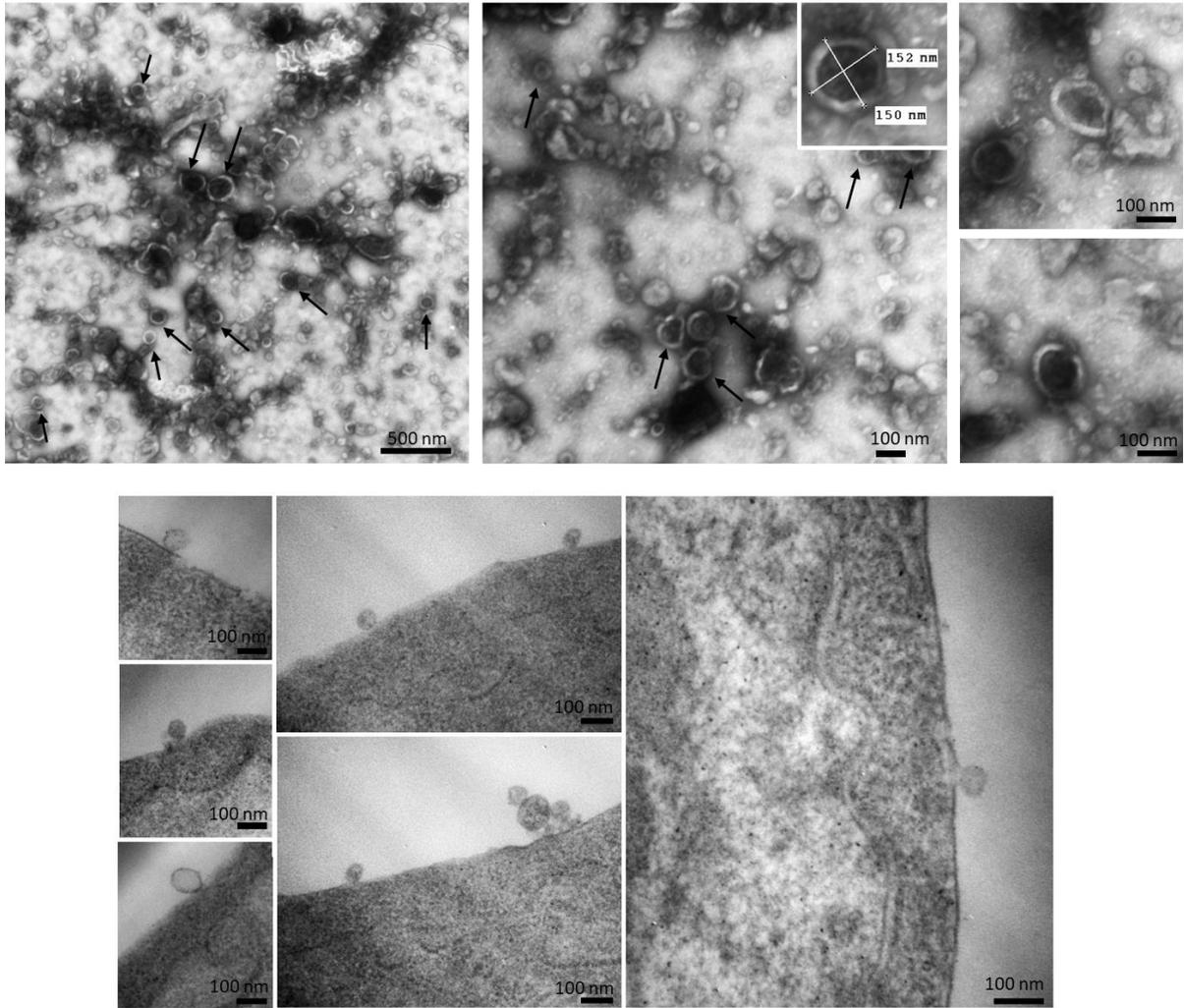


Anexoll.Figura S 5. Imágenes de MET de cortes ultrafinos de células Gag/Emwt-S2 inducidas y VLP1 purificadas.

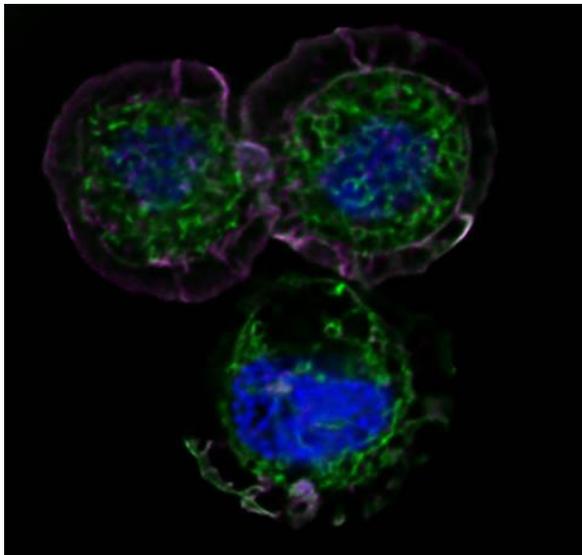
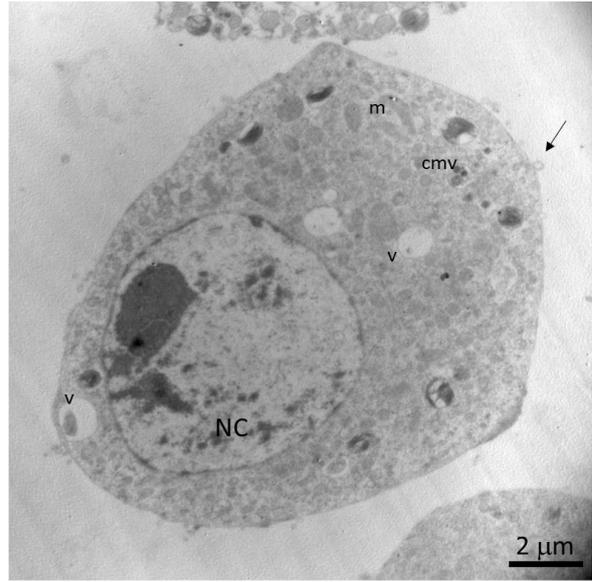
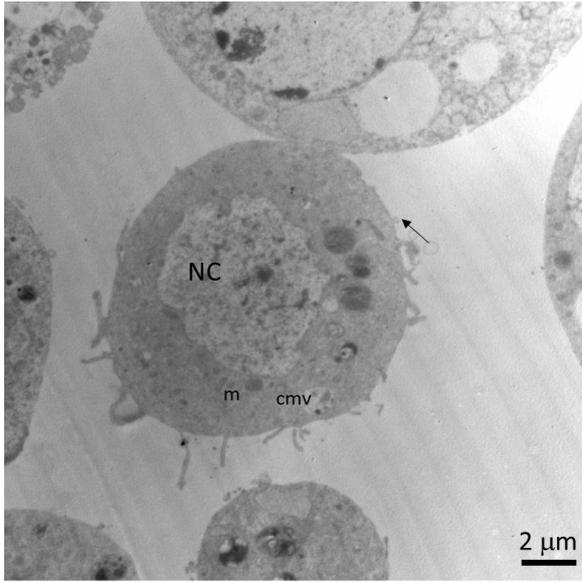


AnexoII.Figura S 6. Visualización de cortes ultrafinos de célula S2 por MET.

Las células S2 productoras de VLP-2 fueron inducidas durante 7 días. Las células se centrifugaron y se fijaron con PFA al 10% en buffer fosfato y glutaraldeído. Se puede apreciar el núcleo (NC), cuerpos multi vesiculares presentes (cmv), vacuolas (v), vesículas y/o VLPs brotando (flecha).



AnexoII.Figura S 7. Imágenes de MET de cortes ultrafinos de células Gag/EnvFm-S2 inducidas y VLP2 purificadas.

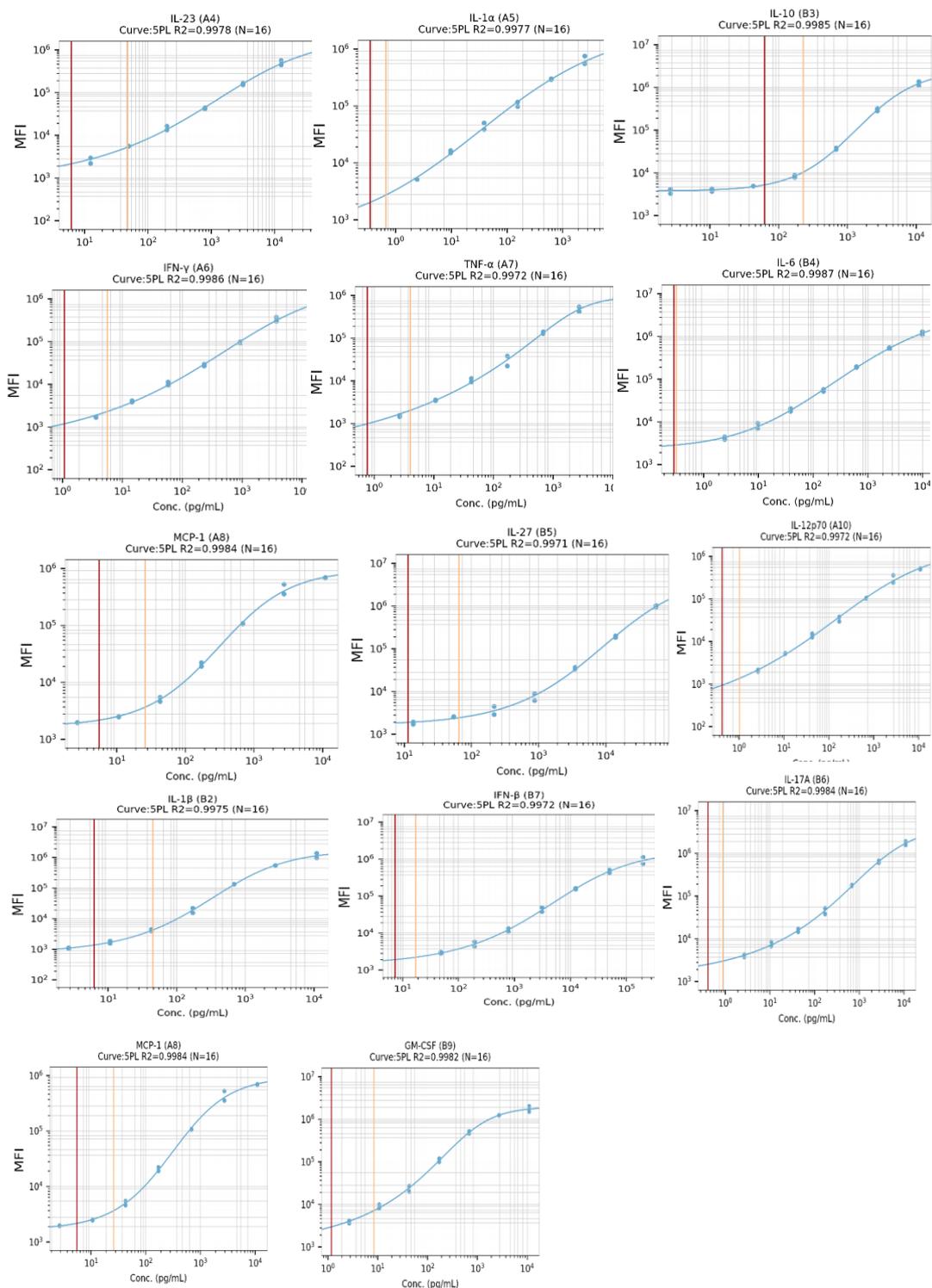


AnexoII.Figura S 8. Visualización de células S2.

Arriba, cortes ultrafinos vistos por MET. Se puede apreciar el núcleo (NC), mitocondrias (m), cuerpos multivesiculares (cmv), vacuolas (v). Se puede apreciar también vesículas brotando (flecha). Abajo, microscopía confocal. El núcleo se marcó con verde de metilo (azul), membranas se marcaron con DiO (verde) y el citoesqueleto se marcó con faloidina (púrpura). El aspecto de lamelipodio del citoesqueleto se debe a que las células se cultivaron sobre una superficie pretratada con concavalina A (ConA), para favorecer su aplanamiento y por tanto su visualización.

13.3 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE

13.3.1 ANÁLISIS DE CITOQUINAS



AnexoII.Figura S 9. Curva de calibración de las citoquinas estudiadas.

Se utilizó el kit LegendPlex Mouse Inflammation Panel (Biologend) el cual es capaz de detectar las Cks: IL-23, IL-1α, IFN-γ, TNF-α, MCP-1, IL-12p70, IL-1β, IL-10, IL-6, IL-27, IFN-β, GM-CSF, IL-17A.

Anexoll. Tabla S 2. Datos obtenidos para cada una de las citoquinas evaluadas en el sobrenadante de esplenocitos murinos estimulados con ectoEnv (WT).

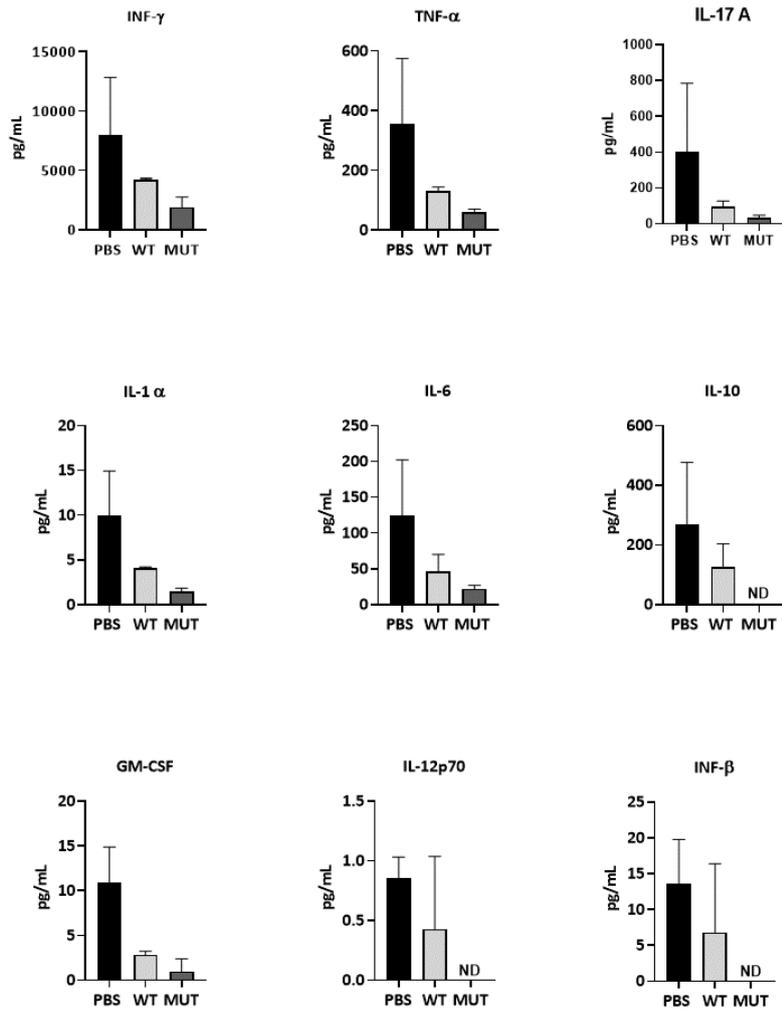
Nombre en placa		IL-23 pg/mL	IL-1a pg/mL	IFN-g pg/mL	TNF-a pg/mL	MCP-1 pg/mL	IL-12p70 pg/mL	IL-1b pg/mL	IL-10 pg/mL	IL-6 pg/mL	IL-27 pg/mL	IL-17A pg/mL	IFN-b pg/mL	GM-CSF pg/mL
A1: Ctrl 0 Oug/mL	Media	<6.21	0,79	275,18	8,86	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	3,18	<11.49	4,47	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,04	50,18	1,69	NA	NA	NA	NA	0,78	NA	1,55	NA	NA
B1: Ctrl 0 Oug/mL	Media	<6.21	0,79	325,84	11,67	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	4,22	<11.49	5,89	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,18	65,39	3,51	NA	NA	NA	NA	0,22	NA	1,48	NA	NA
A7: Ctrl 1 Oug/mL	Media	<6.21	1,04	75,20	13,05	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	2,55	<11.49	0,99	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,15	17,45	3,81	NA	NA	NA	NA	0,69	NA	0,28	NA	NA
B7: Ctrl 1 Oug/mL	Media	<6.21	1,61	470,64	23,22	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	8,76	<11.49	8,71	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,37	118,39	7,14	NA	NA	NA	NA	1,99	NA	1,86	NA	NA
C1: WT5 Oug/mL	Media	<6.21	0,57	485,55	6,64	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	3,09	<11.49	5,52	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,06	44,58	0,65	NA	NA	NA	NA	1,14	NA	1,50	NA	NA
D1: WT5 Oug/mL	Media	<6.21	1,00	682,13	10,70	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	9,32	<11.49	13,73	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,37	85,00	1,72	NA	NA	NA	NA	1,81	NA	0,52	NA	NA
C7: WT6 Oug/mL	Media	<6.21	0,58	32,86	2,61	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	0,48	<11.49	0,78	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,08	1,44	0,91	NA	NA	NA	NA	0,02	NA	0,11	NA	NA
D7: WT6 Oug/mL	Media	<6.21	0,78	73,39	2,87	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	0,61	<11.49	0,69	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,18	25,94	1,73	NA	NA	NA	NA	0,22	NA	0,23	NA	NA
E1: Mut10 Oug/mL	Media	<6.21	0,95	904,60	18,84	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	10,03	<11.49	18,51	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,49	377,02	5,88	NA	NA	NA	NA	0,74	NA	6,75	NA	NA
F1: Mut10 Oug/mL	Media	<6.21	1,62	1593,22	50,11	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	17,83	<11.49	40,61	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,14	250,92	8,46	NA	NA	NA	NA	1,93	NA	9,92	NA	NA
E7: Mut20 Oug/mL	Media	<6.21	0,71	129,78	3,99	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	0,99	<11.49	1,36	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,18	47,49	2,26	NA	NA	NA	NA	0,42	NA	0,90	NA	NA
F7: Mut20 Oug/mL	Media	<6.21	0,68	124,94	3,87	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	0,73	<11.49	1,19	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,13	36,35	1,56	NA	NA	NA	NA	0,24	NA	0,40	NA	NA
A6: Ctrl 0 100ug/mL	Media	<6.21	2,15	53,68	33,54	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	2,79	<11.49	0,95	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,30	12,98	5,92	NA	NA	NA	NA	1,03	NA	0,22	NA	NA
B6: Ctrl 0 100ug/mL	Media	<6.21	4,47	302,54	78,19	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	16,74	<11.49	10,27	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,91	119,13	21,88	NA	NA	NA	NA	5,25	NA	3,06	NA	NA
A12: Ctrl 1 100 ug/mL	Media	<6.21	14,85	734,08	252,43	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	52,71	<11.49	43,36	<7.4	<1.18
	SD	NA	4,59	177,22	55,95	NA	NA	NA	NA	10,60	NA	11,41	NA	NA
B12: Ctrl 1 100 ug/mL	Media	<6.21	12,81	212,30	198,12	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	22,14	<11.49	1,79	<7.4	<1.18
	SD	NA	1,48	27,64	46,50	NA	NA	NA	NA	2,30	NA	0,78	NA	NA
C6: WT5 100ug/mL	Media	<6.21	8,52	763,06	83,49	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	25,60	<11.49	126,88	8,00	1,47
	SD	NA	2,18	130,80	11,83	NA	NA	NA	NA	6,39	NA	27,64	2,00	0,90
D6: WT5 100ug/mL	Media	<6.21	9,48	478,12	50,80	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	21,14	<11.49	21,52	44,75	1,59
	SD	NA	0,64	11,89	15,92	NA	NA	NA	NA	2,10	NA	3,21	10,25	0,35
C12: WT6 100 ug/mL	Media	<6.21	14,87	572,55	172,26	<5.60	0,72	<6.25	<62.85	31,39	<11.49	113,47	<7.4	<1.18
	SD	NA	3,93	141,73	31,00	NA	0,10	NA	NA	7,68	NA	35,73	NA	NA
D12: WT6 100 ug/mL	Media	<6.21	10,18	259,42	96,72	<5.60	0,60	<6.25	<62.85	17,46	<11.49	94,09	37,40	1,50
	SD	NA	2,39	61,21	23,14	NA	0,04	NA	NA	4,92	NA	28,74	8,52	0,01
E6: Mut10 100ug/mL	Media	<6.21	5,20	503,29	37,49	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	5,84	<11.49	12,77	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,81	123,46	18,74	NA	NA	NA	NA	2,35	NA	2,83	NA	NA
F6: Mut10 100ug/mL	Media	<6.21	3,38	582,49	30,88	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	7,34	<11.49	22,56	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,64	97,80	2,51	NA	NA	NA	NA	1,53	NA	2,34	NA	NA
E12: Mut20 100 ug/mL	Media	<6.21	3,31	107,56	37,78	<5.60	3,42	<6.25	<62.85	4,63	11,65	4,37	30,30	2,12
	SD	NA	0,39	24,22	5,67	NA	1,02	NA	NA	0,24	2,82	1,63	12,32	0,93
F12: Mut20 100 ug/mL	Media	<6.21	3,37	72,55	72,22	<5.60	0,56	<6.25	<62.85	9,31	20,50	4,58	12,70	1,39
	SD	NA	0,76	29,63	25,24	NA	0,09	NA	NA	3,39	2,48	2,52	1,56	0,21

Ctrl: control, WT: proteína ectoEnv, MUT: proteína ectoEnvIm. En gris se señalan aquellos valores que quedaron por debajo del límite de cuantificación.

Anexoll. Tabla S 3. Datos obtenidos para cada una de las citoquinas evaluadas en el sobrenadante de esplenocitos murinos estimulados con ConA.

Nombre en la placa		IL-23 pg/mL	IL-1a pg/mL	IFN-g pg/mL	TNF-a pg/mL	MCP-1 pg/mL	IL-12p70 pg/mL	IL-1b pg/mL	IL-10 pg/mL	IL-6 pg/mL	IL-27 pg/mL	IL-17A pg/mL	IFN-b pg/mL	GM-CSF pg/mL
G1: Ctrl 0 ConA	Media	<6.21	6,45	4579,47	199,40	<5.60	0,73	<6.25	123,00	69,60	<11.49	128,34	9,30	8,15
	SD	NA	0,83	542,36	26,89	NA	0,02	NA	12,20	12,11	NA	41,04	0,34	0,23
G2: Ctrl 1 ConA	Media	<6.21	13,47	11408,87	510,95	11,14	0,98	<6.25	415,97	179,69	<11.49	672,66	18,00	13,72
	SD	NA	1,53	2977,25	91,08	2,60	0,36	NA	44,68	26,93	NA	131,03	5,52	3,83
G3: WT5 ConA	Media	<6.21	4,04	4294,31	140,78	<5.60	<0.42	<6.25	181,07	63,18	<11.49	118,20	<7.4	2,57
	SD	NA	0,93	484,89	19,11	NA	NA	NA	16,26	2,40	NA	8,32	NA	0,01
G4: WT6 ConA	Media	<6.21	4,18	4105,72	123,08	6,74	0,86	<6.25	70,91	29,10	<11.49	74,86	12,60	3,13
	SD	NA	1,78	534,58	46,70	0,03	0,02	NA	12,20	13,40	NA	22,40	2,80	0,01
G5: Mut10 ConA	Media	<6.21	1,74	2506,61	67,46	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	25,52	<11.49	44,06	<7.4	1,99
	SD	NA	0,17	557,74	3,85	NA	NA	NA	NA	0,35	NA	4,31	NA	0,04
G6: Mut20 ConA	Media	<6.21	1,18	1278,29	54,47	<5.60	<0.42	<6.25	<62.85	18,31	<11.49	19,43	<7.4	<1.18
	SD	NA	0,39	494,70	16,24	NA	NA	NA	NA	1,12	NA	4,96	NA	NA

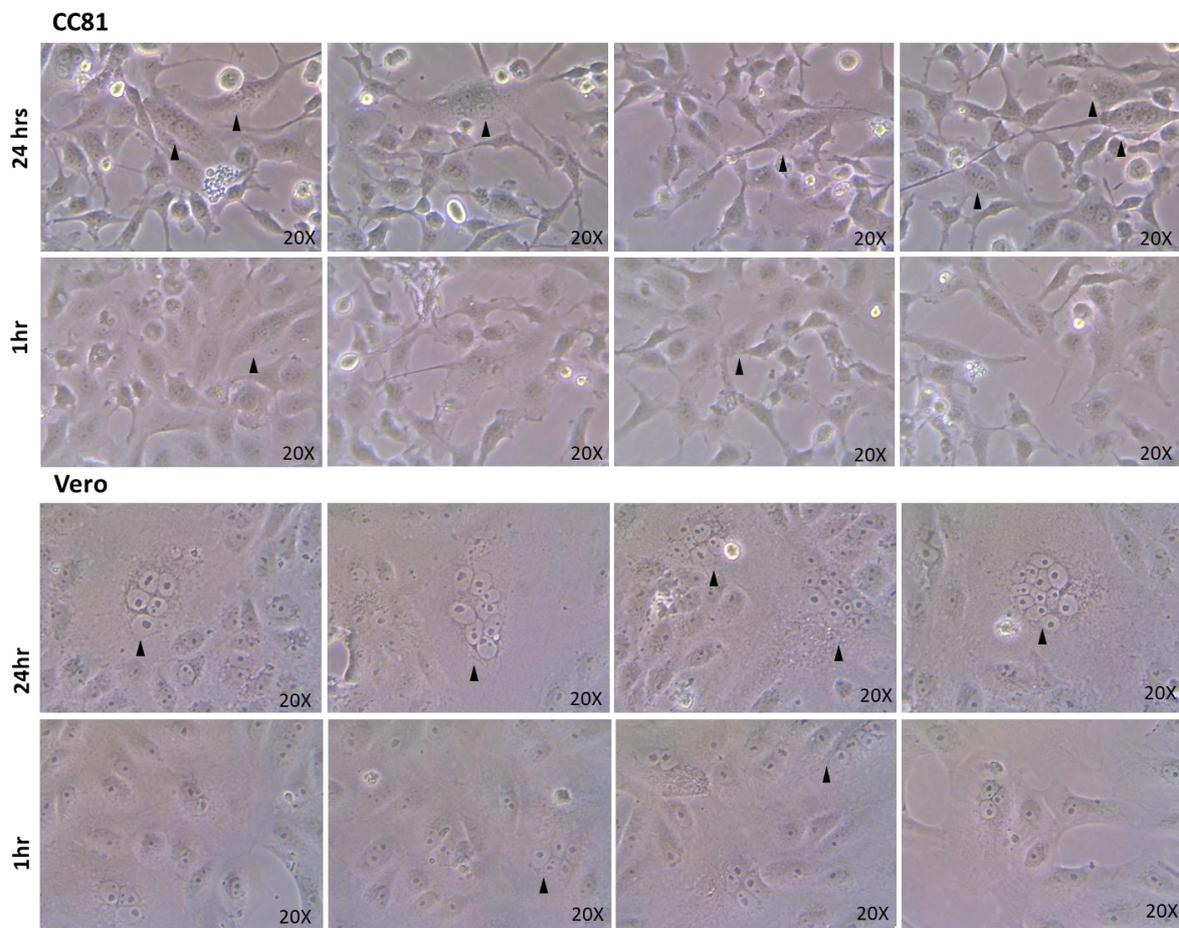
Ctrl: control, WT: proteína ectoEnv, MUT: proteína ectoEnvIm. En gris se señalan aquellos valores que quedaron por debajo del límite de cuantificación.



AnexoII.Figura S 10 Producción de citoquinas por esplenocitos estimulados con ConA.

Los esplenocitos de los ratones inmunizados con las proteínas WT y MUT o con PBS, se estimularon con ConA como control de proliferación. EL sobrenadante de esos esplenocitos se analizó para determinar el perfil de citoquinas liberadas.

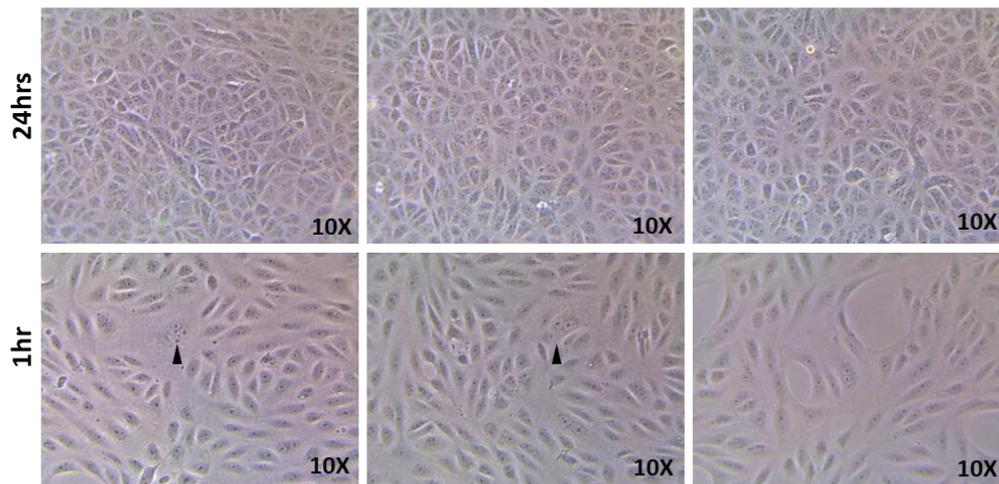
13.4 GENERACIÓN DE LÍNEA REPORTERA PARA LA INFECCIÓN POR VLB



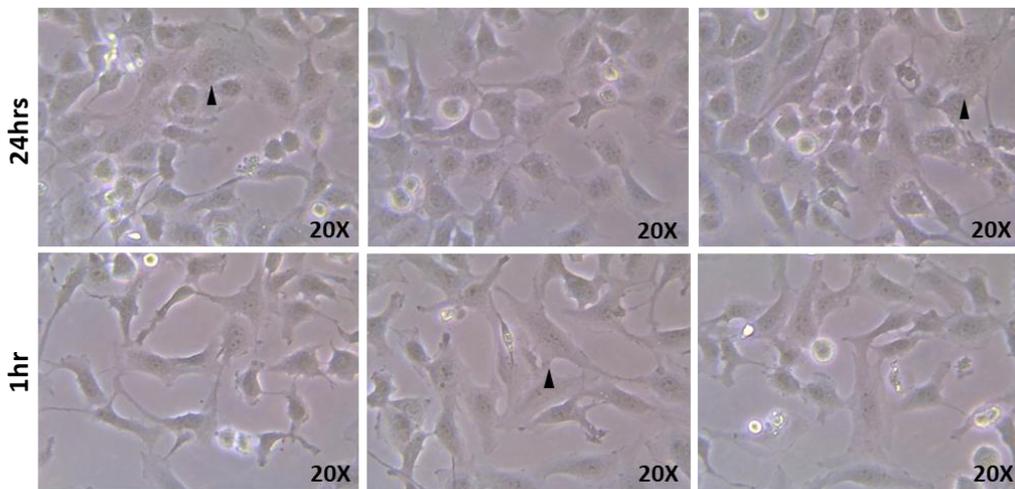
AnexoII.Figura S 11. Infección de células Vero y CC81 con sobrenadantes de células FLK.

Se muestran imágenes representativas de células Vero y CC81 infectadas con sobrenadantes derivados de las líneas celulares FLK persistentemente infectadas con VLB. En ambos casos se evaluó la infección dejando 1 hr o 24 hrs el inóculo viral. Como control se utilizaron células sin infectar. A las 24 hpi se tomaron imágenes con microscopio óptico. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ.

Vero con sobrenadante de BL3.1

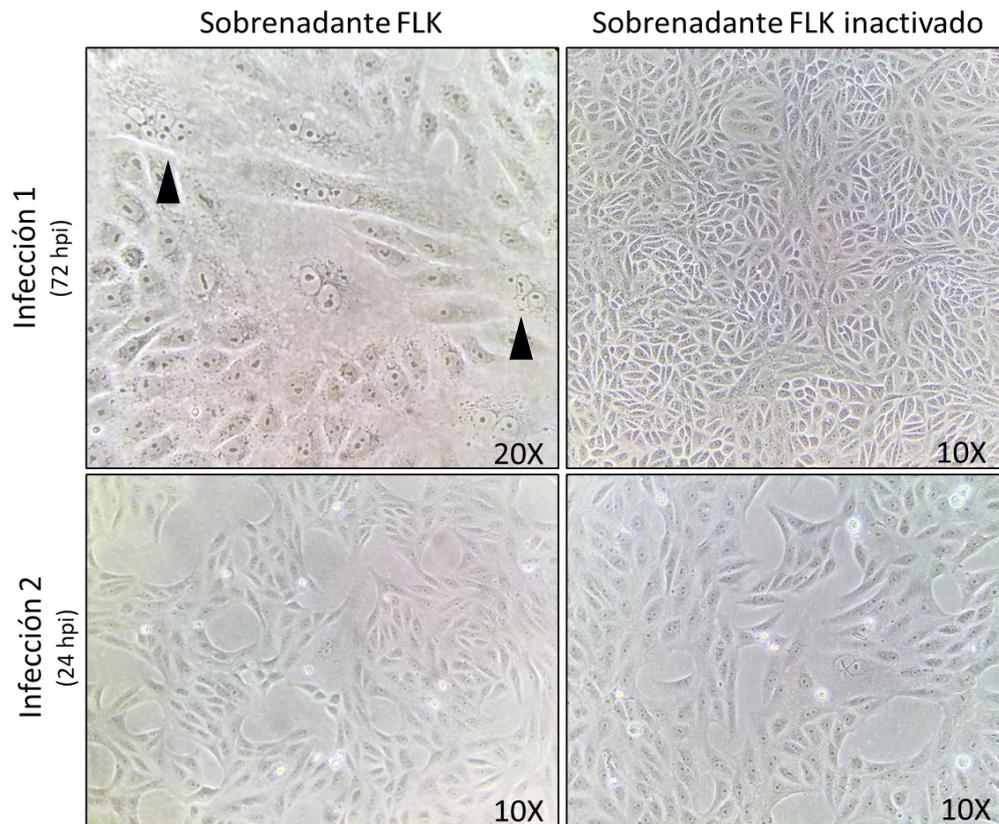


CC81 con sobrenadante de BL3.1



AnexoII.Figura S 12. Infección de células Vero y CC81 con sobrenadantes de BL3.1.

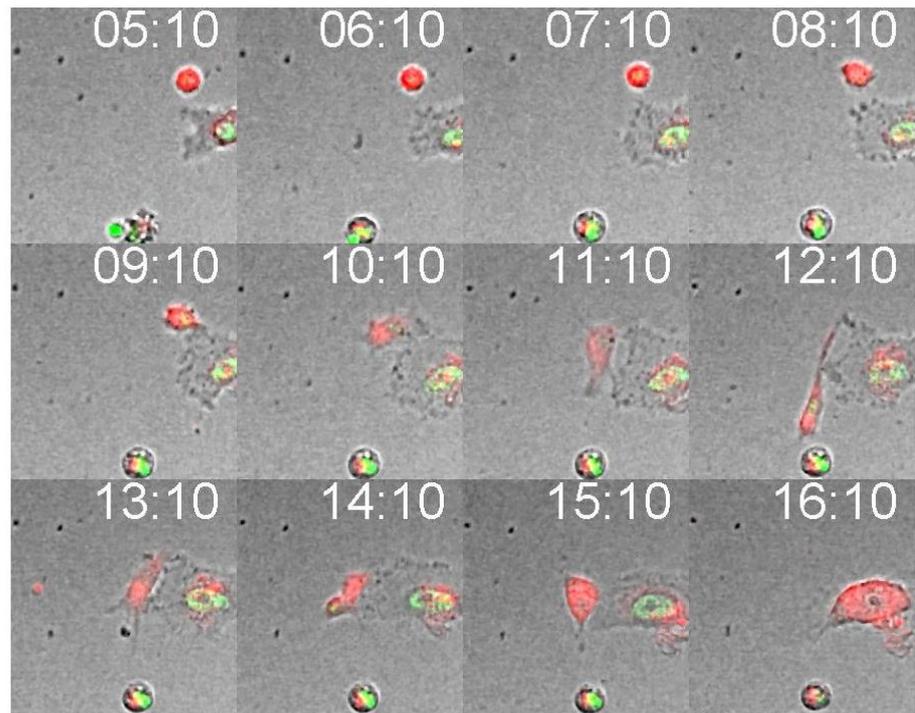
Se evaluó la formación de sincicios en células Vero o CC81 mediante la infección con sobrenadante de células BL3.1 conteniendo partículas de VLB. El inóculo se dejó adsorber durante 1 hr o 24 hrs. A las 24 hrs se evaluó la formación de sincicios. Imágenes representativas tomadas con celular.



Anexo II. Figura S 13. Producción de progenie viral.

Se realizaron pasajes en ciego realizados en células Vero utilizando sobrenadante de FLK inactivado 1hr a 99°C. En la infección inicial (Infección 1) se pudieron observar muy pocos sincicios, más bien sincicios en donde se pudieron observar máximo 9 núcleos. En el primer pasaje en ciego (Infección 2) ya prácticamente no se observó formación de sincicios. Se realizó un segundo pasaje en ciego, en el cual ya no se evidenciaron sincicios. Se incluyó un control de toxicidad (sobrenadante inactivado), en el cual no se observaron sincicios ni en la infección 1 ni en el siguiente 2 pasajes en ciego.

FLK-Dii
CC81-AO



AnexoII.Figura S 14. Fusion from with out. Fusión entre células CC81 y FLK.

La fusión entre las células CC81 y FLK se observó in vivo mediante un experimento de time lapse, en el cual durante 21 hrs se tomaron fotos cada 10 min, tomando 10 campos por pocillo. Se muestra la secuencia de imágenes correspondiente a 11 minutos de tomas donde se puede apreciar la fusión entre las células CC81 y las FLK.

14 ANEXO II. PUBLICACIONES



Expression, Purification, and Characterization of Bovine Leukemia Virus-Like Particles Produced in *Drosophila* S2 Cells

Natalia Olivero-Deibe^{1*}, Lorena Tomé-Poderti^{1,2†}, Federico Carrión^{1†}, Sergio Bianchi^{1,3}, Martín Fló^{1,4}, Daniel Prieto^{5,6}, Florencia Rammauro^{1,4}, Andrés Addiego¹, Natalia Ibañez¹, Madelón Portela⁷, Rosario Duran⁸, Mabel Berois⁹ and Otto Pritsch^{1,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Karen Duus,
Touro University Nevada,
United States

Reviewed by:

Hyesun Jang,
J. Craig Venter Institute, United States
Wolfgang Ernst,
University of Natural Resources and
Life Sciences, Austria

*Correspondence:

Otto Pritsch
pritsch@pasteur.edu.uy
Natalia Olivero-Deibe
nolivero@pasteur.edu.uy

†These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Translational Virology,
a section of the journal
Frontiers in Virology

Received: 10 August 2021

Accepted: 28 September 2021

Published: 03 November 2021

Citation:

Olivero-Deibe N, Tomé-Poderti L,
Carrión F, Bianchi S, Fló M, Prieto D,
Rammauro F, Addiego A, Ibañez N,
Portela M, Duran R, Berois M and
Pritsch O (2021) Expression,
Purification, and Characterization of
Bovine Leukemia Virus-Like Particles
Produced in *Drosophila* S2 Cells.
Front. Virol. 1:756559.
doi: 10.3389/fviro.2021.756559

¹Laboratorio de Inmunovirología, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ²Morphogenèse et Antigénicité du VIH et des Virus des Hépatites (MAVIVH), UMR Inserm U1259, UFR de Médecine, Tours, France, ³Laboratorio de Biomarcadores Moleculares, Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁴Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁵Departamento de Biología de Neurodesarrollo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, ⁶Unidad de Bioimagenología Avanzada, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ⁷Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay, ⁸Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur de Montevideo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay, ⁹Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Bovine leukemia virus (BLV) is an oncogenic deltaretrovirus that infects cattle worldwide. In Uruguay, it is estimated that more than 70% of dairy cattle are infected, causing serious economic losses due to decreased milk production, increased calving interval, and livestock losses due to lymphosarcoma. Several attempts to develop vaccine candidates that activate protective immune responses against BLV were performed, but up to date, there is no vaccine that ensures efficient protection and/or decreased viral transmission. The development and application of new vaccines that effectively control BLV infection represent a major challenge for countries with a high prevalence of infection. In this study, we generated two *Drosophila melanogaster* S2 stable cell lines capable of producing BLV virus-like particles (BLV-VLPs). One of them, BLV-VLP1, expressed both Gag and Env wild-type (Envwt) full-length proteins, whereas BLV-VLP2 contain Gag together with a mutant form of Env non-susceptible to proteolytic maturation by cellular furin type enzymes (EnvFm). We showed that Envwt is properly cleaved by cellular furin, whereas EnvFm is produced as a full-length gp72 precursor, which undergoes some partial cleavage. We observed that said mutation does not drastically affect its expression or its entry into the secretory pathway of S2 insect cells. In addition, it is expressed on the membrane and retains significant structural motifs when expressed in S2 insect cells. Morphology and size of purified BLV-VLPs were analyzed by transmission electron microscopy and dynamic light scattering, showing numerous non-aggregated and approximately spherical particles of variable diameter (70–200 nm) as previously reported for retroviral VLPs produced using different expression systems. Furthermore, we identified two N-glycosylation patterns rich in mannose in EnvFm protein displayed

on VLP2. Our results suggest that the VLPs produced in *Drosophila* S2 cells could be a potential immunogen to be used in the development of BLV vaccines that might contribute, in conjunction with other control strategies, to reduce the transmission of the virus.

Keywords: *bovine leukemia virus* (BLV), virus-like particles (VLP), furin cleavage site, immunogens, Gag, Env, retrovirus

INTRODUCTION

Enzootic bovine leukosis, caused by the *bovine leukemia virus* (BLV), infects cattle worldwide. Two-thirds of the infected animals are asymptomatic, around 30% displays persistent lymphocytosis, and between 5 and 10% develop an aggressive tumor pathology called lymphosarcoma, which frequently causes the death of these animals (1, 2).

Horizontal BLV transmission between herd animals depends on the transfer of infected cells from blood, semen, or mucous fluids. This cellular transfer is carried out by direct contact, by iatrogenic veterinary procedures, or by insect bites. Vertical BLV transmission from cow to calf depends on the transfer of infected cells through the placenta, by contact with infected blood during calving, and through feeding with colostrum and milk from infected cows (3, 4).

BLV infection leads to high economic losses in dairy and beef industries, related to mortality caused by lymphosarcoma (5); negative impact on production parameters (6, 7); immunological alteration and secondary infections (8); and restriction on the international trade of live cattle, semen, and infected embryos (3, 4, 9). European and Oceanian countries have developed efficient programs to control and eradicate BLV infection to reduce economic losses and to control the spread of this disease (3). However, in the Americas region, most countries display high enzootic bovine leukosis prevalence.

In this context, the control strategy designed to fight against BLV infection includes a set of actions aimed at reducing viral transmission. These include improving veterinary practices, physical separation of infected and non-infected animals, and genetic selection of animals resistant to infection. Likewise, the use of vaccines that generate protective immunity has been proposed as an essential tool to reduce BLV infection (2).

Several attempts to develop vaccine candidates that activate protective immune responses against BLV were performed, but up to date, there is no vaccine that ensures efficient protection and/or decreased viral transmission (4). Inactivated virus vaccines (10, 11), cell lysates from BLV-infected cells (12), recombinant viral antigens (gp51 and p24 proteins) (13, 14), and synthetic peptides were tested for immunization. These vaccine candidates demonstrated immunogenicity, but they did not display efficient protection from the BLV challenge. Other vaccines, such as recombinant vaccinia virus expressing BLV envelope protein, only conferred partial protection in sheep but were ineffective in cows. Novel DNA-based vaccines containing env and tax genes elicited strong immune responses but did not prevent later infection or generate an effective immunological memory (15–17). Recently, a new viral-attenuated vaccine

platform based on a BLV provirus with multiple deletions in oncogenic genes (tax, G4, microRNAs) and genes responsible for infectivity or replication was reported (env and G3). This modified provirus is infectious in cattle but displays deficient levels of replication (18, 19). This approach is auspicious, but several regulatory aspects must be solved before its massive use.

The use of virus-like particle (VLP)-based vaccines on preventing different viral diseases appears as an alternative strategy to traditional formulations (20, 21). In general, VLPs mimic the natural virus while lacking the viral genetic material, thus making them safe (without the risk of virus replication) and are highly immunogenic (22, 23). Due to their particulate nature, it is very efficiently uptaken by antigen-presenting cells leading to potent activation of humoral and cellular immune responses (20). VLPs are produced in different cellular systems, including yeast, bacteria, mammalian, plants, and insect cells (24–26). *Drosophila melanogaster* Schneider (S2) cells have been used in the efficient production of several VLP types (27–30). S2 cells display several advantages as a eukaryotic system for protein expression: simple glycosylation profiles, fast-growing in a serum-free medium, very high cell densities without aggregation or toxic metabolite issues, and lack of adventitious agents that could infect humans (27).

Enveloped VLPs usually include scaffold proteins that can be coated by immunogenic proteins to enhance the immune response. In this regard, Yang et al. (28) produced human immunodeficiency virus (HIV) VLPs in S2 cells, including Gag and Env proteins, and demonstrated that HIV Env glycoprotein was properly cleaved, glycosylated, and incorporated into VLPs (28).

BLV Env glycoprotein trimer binds to the cellular receptor cationic amino acid transporter-1/solute carrier family 7 member 1 (31), promoting the fusion of the viral and host cell membranes and plays a crucial role in determining viral infectivity (32, 33). BLV Env is synthesized as a glycosylated polypeptide precursor (gp72) that is cleaved by cellular furin proteases into surface gp51 (SU) and the transmembrane gp30 (TM) subunits; both proteins are associated through a disulfide bond. This cleavage gives rise to a metastable pre-fusion conformation that has the necessary energy to carry out the fusion process once the recognition with the cellular receptor occurs (34). Env is a major target of antiviral immunity, as indicated by the rapid emergence of neutralizing antibodies after viral inoculation (35). The presence of helper CD4+ and cytotoxic T-lymphocyte CD8+ epitopes in gp51 and gp30 indicates that Env also stimulates a T-cell response (32, 35).

The Gag protein plays important structural roles responsible for intracellular transport, direct assembly of virus particles, and catalyzing the budding process (33). Expression of the Gag polyprotein alone can lead to the formation of VLPs (36). BLV

Gag is initially synthesized as a polyprotein that is cleaved into major structural domains [matrix (MA, p15), capsid (CA, p24), and nucleocapsid (NC, p12)] (37). The CA protein is also a major target of antiviral immunity with high antibody titers found in the sera of infected animals and contains two CD4+ epitopes recognized by specific T lymphocytes (38).

BLV VLPs have been produced in different systems by using mammalian, silkworm, or other insect cells. These BLV VLPs were only composed of Gag polyprotein, and none of them contained Env surface glycoprotein (37, 39–41).

In this study, we describe for the first time the production and characterization of BLV VLPs containing Env and Gag immunogenic proteins expressed in *Drosophila melanogaster* S2 stable cell lines. Purified VLP morphology was analyzed by negative staining transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS), showing a polydisperse population with shape and sizes compatible with previously reported data for another retrovirus VLPs (42–49). Gag and Env in VLPs were detected by Western blot and further confirmed by mass spectrometry.

MATERIALS AND METHODS

Construction Design for Protein Expression in *Drosophila* Cells

DNA sequences of BLV (GenBank, access number: EF600696) encoding the precursor Gag protein (amplified from FLK-BLV cells, DSMZ #ACC 153) and Env glycoprotein (synthesized by Genscript) were cloned by RF cloning in pMT/BiP/V5-His expression vector (Invitrogen). All constructs were cloned under the control of *Drosophila* metal-inducible metallothionein promoter (MT), followed by a stop codon immediately after its C-terminus. All sequences were confirmed by automated sequencing (Macrogen, Korea).

Two different constructs (483 aa) were designed to express BLV-Env protein: the native form, pMT/BiP/Envwt, which is processed by cellular furin proteases, giving rise to SU and TM subunits and the furin-mutated form, pMT/BiP/EnvFm, containing a double substitution at positions R301N and R302N to avoid its proteolytic processing (50), leading to a stable Env precursor protein. The *Drosophila* BiP secretory sequence replaced the native signal peptide to ensure its entry into the secretory pathway.

In the case of pMT/Gag, the N-terminus of the Gag protein (393 aa) corresponds to its first native amino acid (lacking the BiP signal from the expression vector) and giving rise to a cytosolic protein.

Stable Transfection of S2 *Drosophila* Cell Line

Twenty-four hours before transfection, S2 cells were seeded in T25 flasks (1×10^6 cells/ml) and grown at 28°C in Schneider's culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and 50-unit penicillin/50-μg streptomycin per milliliter of medium. Co-transfection was performed with 0.1-μg pCoPuro plasmid (Invitrogen; conferring resistance to

puromycin), 1-μg of pMT/Gag, and 1-μg pMT/BiP/Envwt or pMT/BiP/EnvFm using Effectene Transfection Reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Three days post-transfection, 6 μg/ml puromycin was added, and resistant cells were selected and gradually adapted to the protein-free culture medium (Insect Xpress, Lonza) for 4 weeks to generate two stable cell lines Gag/Envwt-S2 and Gag/EnvFm-S2 capable of expressing Gag and Envwt or EnvFm proteins upon induction with 5-μM CdCl₂ (Sigma).

Immunofluorescence Assay

The expression of recombinant proteins was evidenced by indirect immunofluorescence and confocal microscopy. Briefly, 50 μl of induced cells were fixed for 30 min with 4% (v/v) paraformaldehyde in PBS, washed three times with PBS, and subsequently blocked for 15 min with PBS-3%BSA-0.1% Triton X-100. Cells were further incubated 1 h at RT with monoclonal antibodies anti-p24 (BLV3, 1/200) or anti-gp51 (BLV1, 1/500) (VMRD, USA). After three washes with PBS, cells were incubated for 1 h at RT with Alexa Fluor® 594 conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen) diluted 1/1,000 in PBS added with 3% (w/v) BSA and methyl green 1/5,000, washed three times with PBS and mounted in 70% (v/v) glycerol pH 8.8. Cell images were acquired on a Leica TCS SP5 microscope with a 63× oil immersion lens (NA = 1.4), pinhole set at 1 Airy unit. Stacks were deconvolved with FIJI using DeconvolutionLab2 software (51), applying a Fast Iterative Shrinkage-Thresholding algorithm (52) and using a theoretical PSF estimated with the Born and Wolf 3D optical model.

Cell Surface Env Protein Expression Analysis by Flow Cytometry Analysis

Induced or non-induced EnvFm/Gag-S2 cells were incubated with a monoclonal antibody anti-gp51 (BLV1, 1/50) (VMRD, USA) and subsequently stained with a goat anti-mouse IgG Alexa-594 secondary antibody (Invitrogen). Cells were immediately acquired, without permeabilization or fixation, using a BD FACSAria™ Fusion Cell Sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc.). Unstained cells were used as a control of fluorescence background.

Production and Purification of Virus-Like Particles

Envwt/Gag-S2 and EnvFm/Gag-S2 cells were cultured at 28°C with moderate agitation in glass Erlenmeyer flasks and induced with 5-μM CdCl₂ upon reaching a density of 7.5×10^6 cell/ml. Seven days post-induction, cells were harvested by centrifugation at $6,000 \times g$ for 30 min at 4°C, and supernatant was filtered through 0.45 μm. Clarified supernatant was further ultra-centrifuged in a 20% sucrose cushion ($72,000 \times g$ for 1.5 h at 4°C), and the pellet containing VLPs was resuspended in PBS and stored at -80°C (28).

Western Blot

The expression of Envwt, EnvFm, and Gag was evidenced by Western blot analysis from induced cells culture supernatant

and purified VLP fractions. Samples were migrated in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 12% under reducing or non-reducing conditions and electroblotted onto nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham-GE Healthcare) for 2 h at 300 mA and 4°C. Membranes were blocked overnight at 4°C with PBS + 3% (w/v) BSA, incubated for 1 h at RT with monoclonal antibodies: anti-p24 (BLV3, 1/2,000) or anti-gp51 (BLV2, 1/2,000) (VMRD, USA) and vigorously washed three times for 5 min with PBS + 0.3% (v/v) Tween 20. Membranes were then incubated with goat anti-mouse monoclonal antibody conjugated to peroxidase (1/5,000) (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at RT and washed as previously described. Both primary and secondary antibodies were diluted in PBS + 3% (w/v) BSA and 0.3% (v/v) Tween 20. Finally, membranes were incubated 5 min at RT with the enhanced chemiluminescence enzyme substrate kit (Thermo Fisher Scientific, USA), exposed to Hyperfilm enhanced chemiluminescence (GE Healthcare), and manually developed.

Identification of EnvFm and Gag Proteins by Mass Spectrometry

Purified VLPs were migrated in reducing 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue, and the fraction corresponding to molecular weights between 35 and 80 kDa was cut under keratin-free conditions. Proteins were in-gel digested with trypsin (Sequencing grade Promega) at 37°C overnight. Peptide mixtures extracted from gels were desalted using micro-columns (C18 ZipTip®, Merck, Millipore), eluted in 60% ACN/0.1% formic acid, dried and resuspended in 0.1% formic acid, before nano-LC mass spectrometry (MS)/MS analysis. Tryptic peptides were separated using a nano-HPLC (UltiMate 3000, Thermo Scientific) coupled online with a hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Q-Exactive Plus, Thermo Scientific). Peptide mixtures were injected into a trap column (Acclaim PepMap 100, C18, Thermo Scientific) and separated into a PepMap™ RSLC C18 column (2 μm, 100A, 75 μm ID, 50 cm length) at a flow rate of 200 nl/min. Elution was performed using the following gradient: 1–55% B over 86 min and 55–99% B over 9 min at a constant flow rate of 200 nl/min [A: 0.1% formic acid in water, B: 0.1% formic acid in acetonitrile (ACN)]. The mass spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode with automatic switching between MS and MS/MS scans. The full MS scans were acquired at 70 K resolution, and MS/MS was performed using a data-dependent top 12 method at a resolution of 17.5 K using a dynamic exclusion list. Bioinformatics data analysis was performed using PatternLab for Proteomics software, v 4.0.0.84 (<http://patternlabforproteomics.org>). A target-decoy database was generated using *Drosophila melanogaster* UP000000803 from Uniprot (<https://www.uniprot.org>) 2018/10/31 added with the amino acidic sequences of Gag, EnvFm, and 127 most common contaminants. Search parameters were set as follows: tryptic peptides; methionine oxidation and asparagine glycosylation (Hex3HexNAc2 and Hex3HexNAc2dHex) as variable modifications. Peptide spectrum matches were filtered using the Search Engine Processor (SEPro) using the following

parameters: precursor mass tolerance 10 ppm; FDR < 1% at the protein level. The mass spectrometry proteomics raw data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (53) partner repository with the dataset identifier PXD027973.

Analysis of Virus-Like Particles by Transmission Electron Microscopy

Purified VLPs were deposited onto copper grids covered with commercial carbon/Formvar film, stained with 1–3% uranyl acetate, washed with Milli-Q water or 0.1-M KCl, and the excess liquid was removed by absorption with regular tissue paper. TEM images were obtained in a JEOL JEM-1010 microscope operated at 80 kV.

Analysis of Transfected S2 Cells by Transmission Electron Microscopy

Induced cells producing VLPs were obtained by centrifugation at 250 × g for 5 min, fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in PBS, pH 7.2–7.4 and further washed with PBS. A post-fixation step with 1% osmium tetroxide (OsO₄) in distilled water was carried out, washed with distilled water and finally dehydrated through a graded [25, 50, 75, 95, and 100% (v/v)] ethanol-water series. The material was infiltrated with Araldite epoxy resin and after polymerization blocks were semi-thin (about 300 nm) and ultra-thin (~70 nm) sectioned using a RMC MT-X ultramicrotome. Ultra-thin cuts were mounted on formvar-coated copper grids, stained in 2% aqueous uranyl acetate followed by Reynold's lead citrate, and visualized in a Jeol JEM-1010 transmission electron microscope operated at 80 kV.

Dynamic Light Scattering

Purified VLPs were analyzed by DLS using a Zetasizer Nano S (Malvern Panalytical). Samples were pre-incubated at 25°C for 10 min and measured with automatic parameter using disposable plastic cuvettes (UVette, Eppendorf). Data from triplicate measurements were averaged and analyzed with Zetasizer Software v.7.13 (Malvern Panalytical) to obtain size distribution of the samples.

RESULTS

Expression of Envwt, EnvFm, and Gag Protein in *Drosophila* S2 Cells

S2 *Drosophila* cells were co-transfected with plasmids pMT/Gag and pMT/BiP/Envwt or pMT/BiP/EnvFm to express Gag and Envwt or EnvFm proteins, respectively (Figure 1A). Transfected cells were selected with puromycin and progressively adapted to grow in protein-free culture medium, generating stable polyclonal cell lines Gag/Envwt-S2 and Gag/EnvFm-S2 to produce BLV-VLPs identified as VLP1 and VLP2, respectively (Figure 1B).

The presence of Gag, Envwt, and EnvFm proteins was first confirmed by Western blot analysis in reducing conditions, in the culture supernatant after 7 days post-induction (Figure 1C). Gag protein, with an expected size of 42.8 kDa, was detected with an anti-p24 monoclonal antibody (BLV3) in both cell

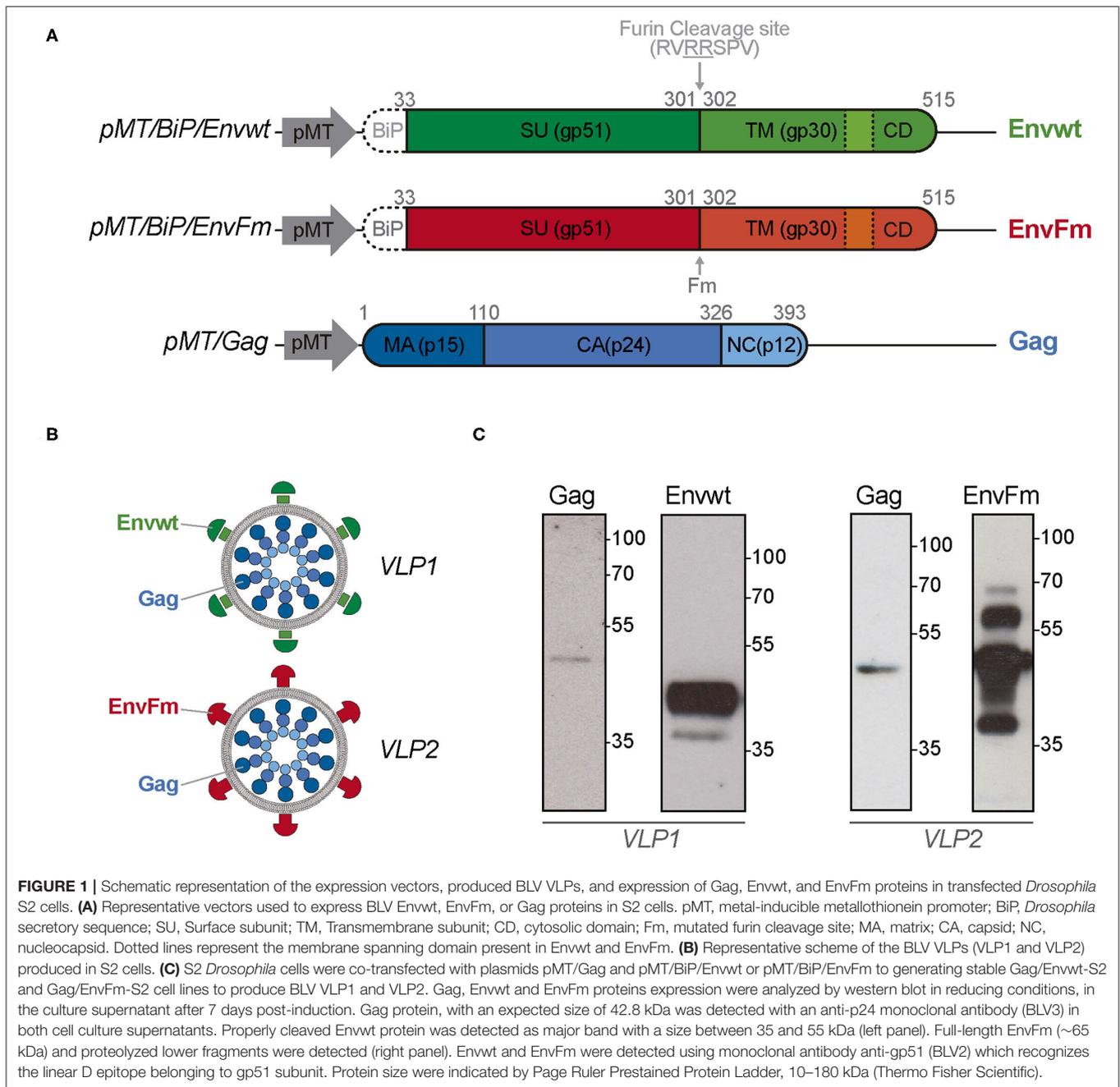


FIGURE 1 | Schematic representation of the expression vectors, produced BLV VLPs, and expression of Gag, Envwt, and EnvFm proteins in transfected *Drosophila* S2 cells. **(A)** Representative vectors used to express BLV Envwt, EnvFm, or Gag proteins in S2 cells. pMT, metal-inducible metallothionein promoter; BiP, *Drosophila* secretory sequence; SU, Surface subunit; TM, Transmembrane subunit; CD, cytosolic domain; Fm, mutated furin cleavage site; MA, matrix; CA, capsid; NC, nucleocapsid. Dotted lines represent the membrane spanning domain present in Envwt and EnvFm. **(B)** Representative scheme of the BLV VLPs (VLP1 and VLP2) produced in S2 cells. **(C)** S2 *Drosophila* cells were co-transfected with plasmids pMT/Gag and pMT/BiP/Envwt or pMT/BiP/EnvFm to generating stable Gag/Envwt-S2 and Gag/EnvFm-S2 cell lines to produce BLV VLP1 and VLP2. Gag, Envwt and EnvFm proteins expression were analyzed by western blot in reducing conditions, in the culture supernatant after 7 days post-induction. Gag protein, with an expected size of 42.8 kDa was detected with an anti-p24 monoclonal antibody (BLV3) in both cell culture supernatants. Properly cleaved Envwt protein was detected as major band with a size between 35 and 55 kDa (left panel). Full-length EnvFm (~65 kDa) and proteolyzed lower fragments were detected (right panel). Envwt and EnvFm were detected using monoclonal antibody anti-gp51 (BLV2) which recognizes the linear D epitope belonging to gp51 subunit. Protein size were indicated by Page Ruler Prestained Protein Ladder, 10–180 kDa (Thermo Fisher Scientific).

culture supernatants. Because Gag protein is devoid of secretory signal peptides, its presence in the culture medium could be associated with its incorporation into VLPs (Figure 1C). In the case of Envwt, a major band with a size between 35 and 55 kDa was detected with monoclonal antibody BLV2, which recognizes the linear D epitope belonging to gp51 subunit. This result is in agreement with proteolytic processing of Envwt by cellular furin endopeptidases, giving rise to gp51 subunit (~40 kDa) detected by BLV2 antibody and the gp30 subunit (~24 kDa) not detected by this antibody.

On the other hand, the BLV2 antibody detects a band with a size according to the expected full-length protein (~65 kDa) in EnvFm cell culture supernatant, along with bands of lower sizes (probably related to proteolysis over 7 days of induction) (Figure 1C). Expression of Gag, Envwt, and EnvFm was detected in transfected S2 cells after 7 days of induction by immunofluorescence using monoclonal antibodies BLV1 directed against the conformational epitope G of Env (gp51) and BLV3 against the capsid protein, p24 (Figure 2A and Supplementary Figure 1A). In both cases, Gag and Env proteins were exclusively detected in transfected cells, and

no expression was detected in untransfected S2 cells. These results show that both Gag and Env proteins were expressed in transfected S2 cells and despite the modification of the highly conserved furin cleavage site (in EnvFm), this mutant may be successfully expressed representing a suitable candidate to stabilize a prefusion-like version of Env in BLV VLPs, which could be used as an immunogen. To gain insight into the feasibility of this alternative, we further characterized VLP2.

The proper display of EnvFm protein on the membrane of Gag/EnvFm-S2 cells upon induction, which is a prerequisite for its incorporation into VLPs, was demonstrated by flow cytometry (**Figure 2B**). When non-induced unpermeabilized Gag/EnvFm-S2 cells were treated/stained with BLV1 monoclonal antibody, no change in the median fluorescence intensity (MFI) compared with unstained control cells was observed. Regarding the induced culture, an MFI shift was detected in those cells expressing EnvFm, showing that abrogation of proteolytic processing by furin does not hamper its transport and final anchoring on the membrane of S2 cells, allowing its specific detection with a conformational anti-BLV gp51 antibody.

Incorporation of Gag and Env Proteins Into Virus-Like Particles

Previous results allowed us to produce and purify BLV VLPs according to the protocol schematized in **Figure 2C** to produce particles displaying wild-type Env (VLP1) and pre-fusion like Env (VLP2). Purified VLPs were analyzed by Western blot using anti-p24 and anti-gp51 monoclonal antibodies. For VLP1, Gag was detected as a unique band with the size according to a molecular weight of 42.8 kDa (**Supplementary Figure 1B**), whereas Envwt was evidenced as a ~40 kDa band corresponding to fully processed gp51 subunit, as described before in the Western blot results from cell culture supernatant. For VLP2 under non-reducing conditions (NR), EnvFm was detected as species with sizes >180 kDa, in agreement with the expected size of the Env trimer (~200 kDa) or even multimers probably stabilized by disulfide bridges (**Figure 2D**). To evaluate this, we also analyzed VLP2 by Western blot under reducing conditions, revealing the presence of a band corresponding to EnvFm size (~70 kDa) along with other bands of lower sizes ~35–40 kDa, which are not detected under NR conditions (**Figure 2D**). These results indicate that part of the EnvFm protein is found as a full-length precursor gp72 (64.5 kDa, theoretical mass) together with smaller size species held together by disulfide bridges. The presence of Gag in VLP2 was also evidenced by Western blot under reducing conditions showing the same results as seen for VLP1 (**Figure 2D**).

Identification of Gag and EnvFm Proteins by Mass Spectrometry

The identity of EnvFm and Gag proteins from VLP2 was assessed by LC-MS/MS analysis after SDS-PAGE band digestion with trypsin. The sequence of both proteins with peptides identified from three independent replicates highlighted (**Supplementary Table 1**) are shown in **Figure 3A**. In the case of Gag, the total sequence coverage was 17.5 %, including

the PPPY motif located in the MA domain, which was fully identified with a 100% sequence coverage. In the case of EnvFm, the BiP sequence was not detected in any case as expected for a fully processed protein entering the secretory pathway, so it is not included starting at amino acid position 33. Sequence identification coverage for EnvFm was 25%, allowing the confirmation of both linear and conformational epitopes. Conformational H and F epitopes, linear E epitope and conserved CX₆CC motif were identified with 100% coverage, whereas for conformational G epitope, 4 of 5 amino acid residues were also confirmed. Other sequences, such as the neutralization domain, the CD4+ and CD8+ T cell epitopes, 4-3 heptad repeat domain and the immunosuppressive peptide, were partially identified. A unique glycosylated peptide in EnvFm was identified by MS/MS (SWALLLNQTAR) with two N-glycan residues, Man3GlcNAc2Fuc (m/z = 1,038.38 Da) (**Figure 3B**) or Man3GlcNAc2 (m/z = 892,32 Da) (**Supplementary Figure 2**).

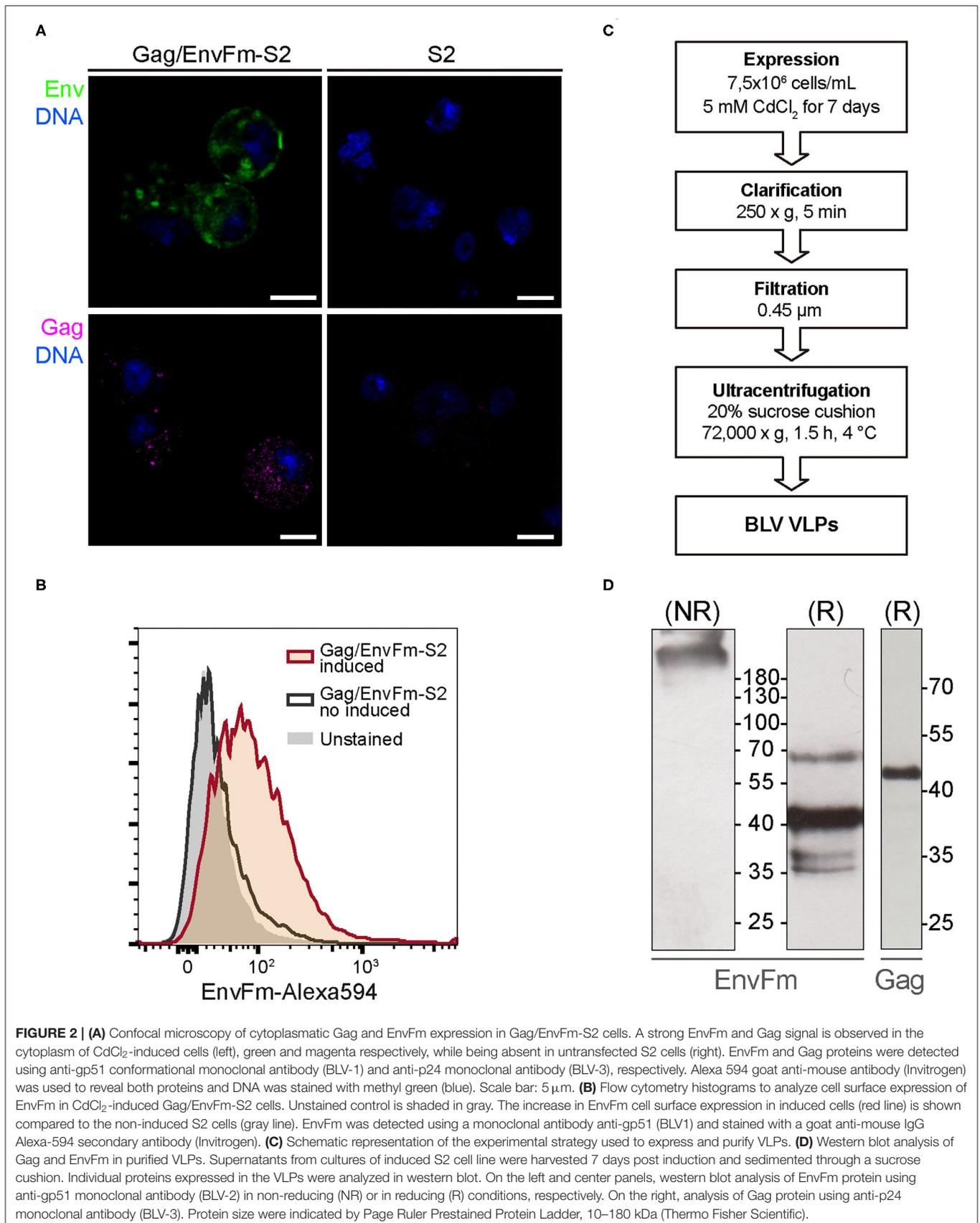
Morphology and Size of BLV Virus-Like Particles

Gag/EnvFm-S2 cells were analyzed by TEM, showing budding structures on its surface with size and shape resembling VLPs (**Figure 4A**). Purified VLPs were also analyzed by negatively stained TEM showing numerous non-aggregated and approximately spherical particles of variable diameter (70–200 nm). Within this polydisperse population, VLPs were observed as particles surrounded by a lipid membrane (shiny in appearance) with an electrondense nucleus (**Figure 4B** and **Supplementary Figure 1C**) as previously reported retroviral VLPs produced using different expression systems (42–49). Size distribution of purified VLPs was analyzed by DLS revealing the presence of monomodal size distribution with a unique peak by intensity, with a polydisperse population characterized by a z-average hydrodynamic radius (z-ave R_H ± sd) of 102.1 ± 50.04 nm for VLP1 (**Supplementary Figure 1D**) and 93.02 ± 36.72 nm for VLP2 (**Figure 4C**) with polydispersity index (PdI) values of 0.156 and 0.240 (polydisperse), respectively. DLS results confirmed the polydisperse and non-aggregated nature of purified VLPs in agreement with TEM results.

DISCUSSION

Trimeric Env glycoprotein is displayed on the surface of retroviral particles as a metastable conformer. After being processed by furin protease, SU and TM subunits are held together through inter-subunit disulfide bond among other molecular contacts. Despite this mechanism is not fully understood, disulfide isomerization leading to establishment of intra-subunit bonds and dissociation of SU and TM subunits generates a dramatic conformational change resulting in viral and cellular membranes fusion.

This conformational change leads to exposure of non-neutralizing regions of Env to the immune system, giving rise to an immune evasion mechanism known for several retroviruses such as HTLV (55) and HIV (56). Moreover, gp120 from HIV (analogous to BLV gp51 subunit) was found to be very



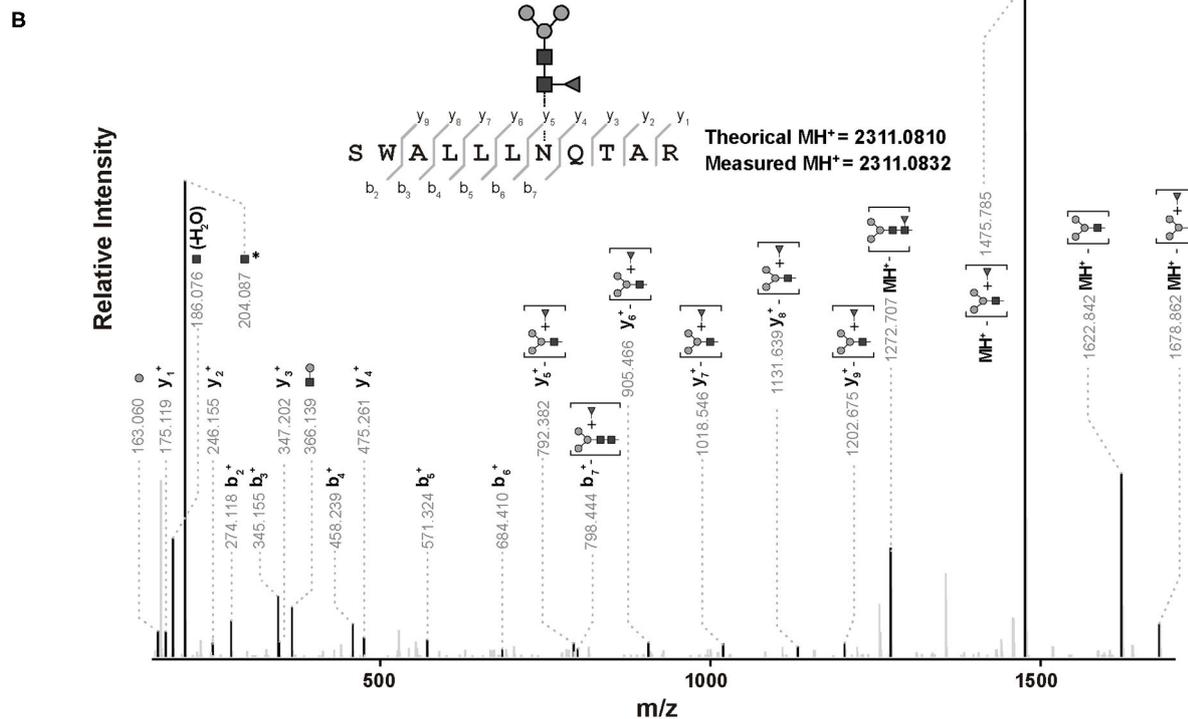
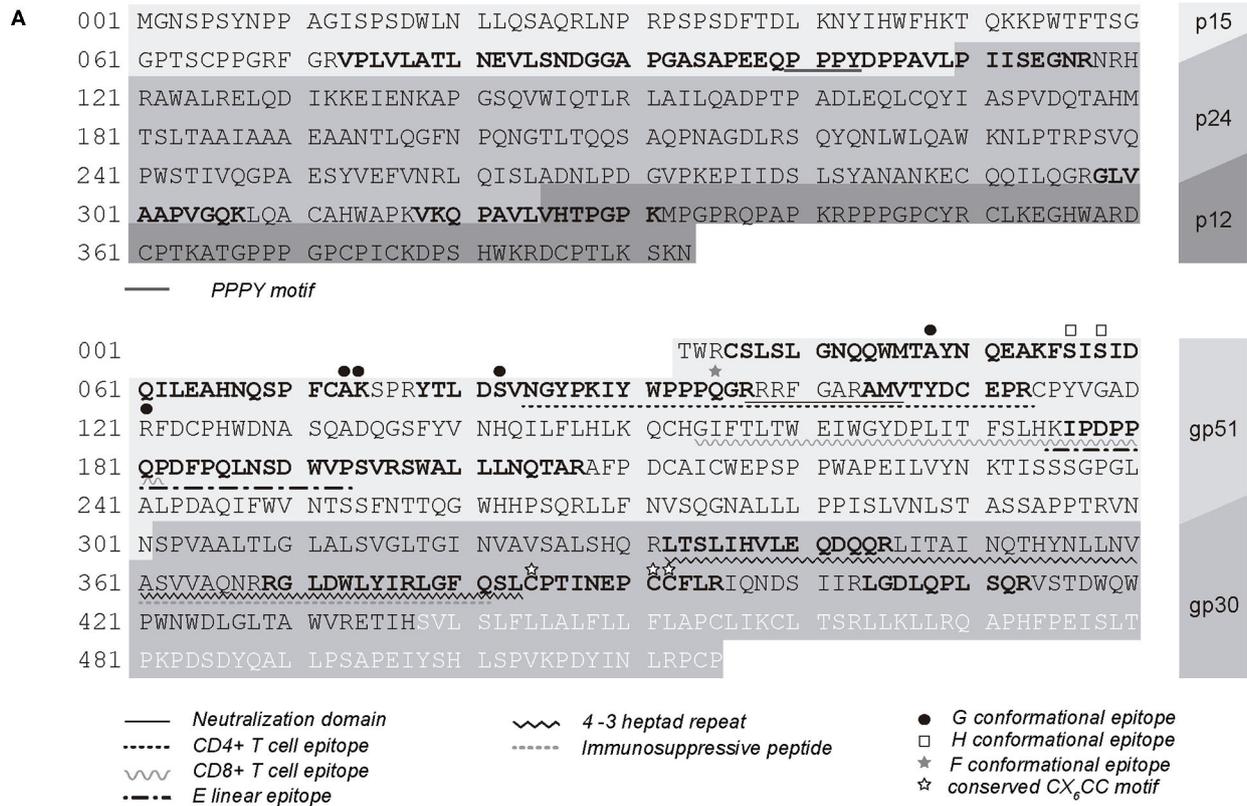


FIGURE 3 | Identification of amino acid sequence Gag and EnvFm expressed VLP2 by mass spectrometry. **(A)** Amino acid sequence of Gag (up) and EnvFm (down) of BLV VLP2. Those peptides identified by MS in three replicates are shown in bold. The sequence of the different proteins in the construction are depicted with different shades of grays. Conformational epitopes G, H, and F, and CX₆CC motif are marked above the text. The remaining motifs are indicated below the text (54). **(B)** Representative MS/MS spectrum of the EnvFm N-glycosylated peptide (sequence SWALLLNQ TAR modified with Man3GlcNAc2Fuc doubly charged ion, m/z: 1,156.546. The N-terminal and C-terminal fragment ions, including those with partial loss of the glycan structure are labeled.

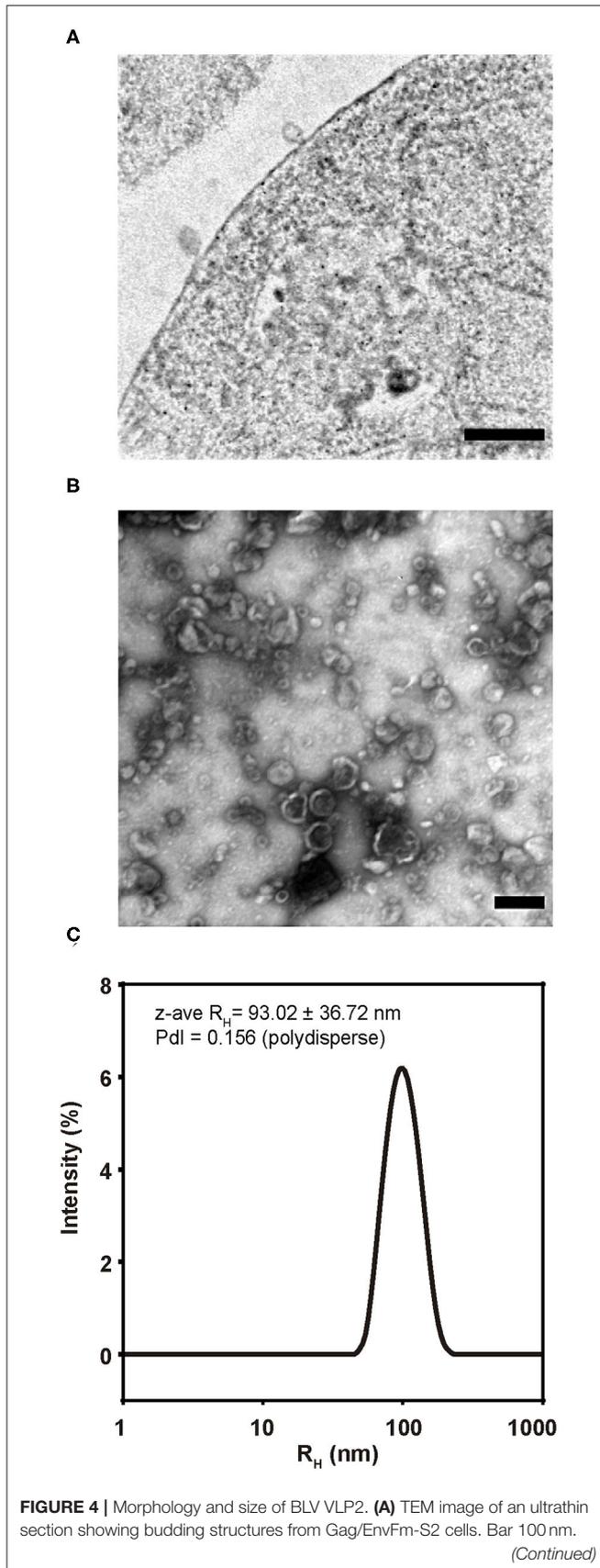


FIGURE 4 | (B) TEM image of purified VLP2 negatively stained. Numerous non-aggregated and approximately spherical particles of variable diameter (70–200 nm) were observed. Bar 100 nm. **(C)** Size distribution of purified VLP2 analyzed by DLS. Monomodal size distribution with a unique peak by intensity, with a polydisperse population was observed. The size distribution is shown as the average of triplicate measurements and mean size represented as z-average R_H (z-ave R_H) (in nm with its standard deviation) and the polydispersity index (Pdl) are shown.

flexible (57), resulting in an immune system presentation that may involve different structural conformations, thus diverting attention from functional Env. This conformational diversity also imposes significant barriers in the development of efficient vaccines aimed to induce broadly neutralizing antibodies, and several strategies have been proposed to stabilize Env trimers in the pre-fusion state (58–61). Recently, Gonelli et al. (62) generated VLPs displaying stabilized HIV Env trimers by introducing inter-subunit disulfides and a proline substitution (SOSIP) mutation. The resulting modified VLPs can efficiently activate B cells by displaying epitopes recognized by broadly neutralizing antibodies while minimizing exposure of non-neutralizing antibody sites (62).

Our group has previously expressed soluble ectodomain of BLV Env proteins in S2 insect cells, giving rise to unstable gp51-gp30 complexes (for ectoEnvwt), which show a high tendency to form aggregates; meanwhile, a proteolytic processing defective mutant (ectoEnvFm) showed higher stability (63). Previous works intended to produce HIV VLPs in insect cells showed Env maturation probably driven as a consequence of endogenous furin proteases present in S2 *Drosophila* cells (28, 43, 64), so we decided to mutate the proteolytic processing site of Env, to keep both gp51 and gp30 epitopes bound to the VLP surface and, at the same time, lock the protein in a more stable pre-fusion-like conformation, thus reducing immune evasion. The inclusion of other sequence modifications may also be further considered, but the lack of tridimensional structural data of BLV Env trimer does not allow us to step forward into a rational design. The newly reported Alpha Fold artificial intelligence program, which performs predictions of protein 3D structures from its aminoacid sequences may be a potentially helpful alternative to solve this problem (65).

In this work, we transfected S2 *Drosophila* cells with expression plasmids encoding BLV Gag and Env proteins to generate stable cell lines capable of producing two types of BLV VLPs. The expression of Gag, Envwt, and EnvFm proteins in both stable cell lines was confirmed by Western blot and immunofluorescence and its antigenicity evidenced using monoclonal antibodies recognizing linear and conformational epitopes. Furthermore, the incorporation of the EnvFm protein into the membrane of transfected cells was confirmed by flow cytometry. Altogether, these results show that the mutation of Env does not drastically affect neither its expression nor its entry into the secretory pathway of S2 insect cells. In addition, its detection by BLV1 monoclonal antibody (recognizing a conformational epitope) suggests that EnvFm retain important structural motifs when expressed in S2 insect cells.

The presence of Gag, Envwt, and EnvFm in purified VLPs was also demonstrated by Western blot analysis. For VLP1, only one band with molecular weight corresponding to gp51 is detected, indicating that Envwt is fully processed by cellular furin proteases as expected. EnvFm displayed on VLP2 is produced as a full-length gp72 precursor that undergoes some partial cleavage, along with additional fragments showing smaller and discrete sizes, which remains covalently bound by disulfide bonds and displayed on BLV VLPs. The genesis of this partial proteolysis remains elusive to us, being the recognition of other sequences in a less efficient way by different *Drosophila* furin proteases, a plausible explanation for this (66). On the other hand, we cannot exclude the possibility that a proportion of the EnvFm protein is cleaved by other intracellular proteases. In fact, cellular proteases play crucial roles by regulating the conformation of major viral proteins (67, 68). The existence of undescribed hydrolysis sites for other cellular proteases cannot be ruled out (69).

The identity of EnvFm and Gag proteins from purified VLP2 was further confirmed by mass spectrometry. In the case of EnvFm, several peptides were detected, allowing the identification of distinctive motifs, some of them containing conformational and linear epitopes of gp51 in agreement with results obtained by immunofluorescence and flow cytometry assays.

Regarding the glycosylation of EnvFm, we identified two paucimannosidic residues at asparagine 203, in agreement with previous results obtained with the recombinant soluble ectodomain of BLV-Env expressed in S2 *Drosophila* cells in our laboratory (63) and in accordance with the type of glycosylation described in insect cells (70, 71). The presence of an N-glycosylation site at this position, which has been demonstrated to be essential for BLV *in vitro* infection (72), remains as an important feature in our attempt to produce non-infectious particles showing epitopes mimicking those found in native virions. N-glycosylation of Env protein is essential for BLV infectivity and could be responsible for antigenic determinants (72, 73). In this regard, taking into account the low coverage of sequence identification obtained by MS, along with previous results obtained in our group (63) reflects that as in native BLV virions, Env protein present in VLPs is highly glycosylated even if N-glycans are paucimannosidic thus less complex than in mammalian cells. Moreover, the electrophoretic migration of EnvFm identified by western blot agrees with the presence of several modifications which increases the overall mass of the protein. In this regard, antigen paucimannosylation may represent a promising mechanism to increase vaccine immunogenicity (74).

In the case of Gag, one of the identified peptides on the MA domain (p15) contains the PPPY motif which is essential in the assembly and budding of the BLV particle (37, 75).

Structures with size and shape resembling budding VLPs were visualized in TEM images obtained from ultrathin sections of transfected S2 cells. TEM analysis of purified VLPs showed the presence of non-aggregated spherical vesicles with variable size and DLS results confirmed the polydisperse and non-aggregated nature of this fraction. This polydispersity could be associated with the existence of VLPs with variable size, however we

cannot rule out the coexistence of membrane-covered vesicles with similar density (exosomes, microvesicles) which could be copurified in VLPs fraction (76).

A series of attempts have been performed before to develop vaccines capable of generating protective responses against BLV; however, until now, no vaccine candidate ensures efficient protection and/or decreased transmission of BLV infection in cattle (15, 16, 77–82).

Th1 responses, particularly involving cytotoxic T lymphocytes (CTL), are proposed to mediate immunity against retroviruses, including BLV (79). Vaccine trials in sheep have shown efficacy in protection against BLV challenge, and this has been correlated with a Th1-polarized cellular immune response (80, 81). However, in cattle, vaccine trials shown a lack of protection efficacy that was correlated with a Th2 polarized response (77). These results indicate that it would be important to include adjuvants in vaccine formulations that can polarize the type of response toward Th1 to improve anti-viral protection. The presence of adequate neutralizing antibody levels and a strong CTL-mediated cellular response would be desirable characteristics for an efficient anti-BLV vaccine (83).

The use of an attenuated vaccine composed of a provirus with deletions and mutations located in BLV genomic regions involved in viral pathogenesis represent a very promising approach. This live-attenuated vaccine is infectious in cattle but replicates at reduced levels in cows and is able to efficiently stimulate the humoral and cellular immune response in cattle (84). However, risks as genetic drift, antigenic change or acquisition of mutations that increase pathogenicity, such as substituting by N230E of an N-linked envelope glycosylation site, must be considered significant concerns (18).

In this work, we developed BLV VLPs containing full-length Env and Gag proteins. As mentioned by Bai et al. (32), one of the major problems of using only BLV gp51 protein as the immunogen is due to the high variability of CTL epitopes within this subunit. Therefore, the best candidate for a vaccine against BLV would contain the full-length Env protein, as gp30 CTL epitopes appear to be less polymorphic (32) and will contribute better in the development of an efficient immune response. Our results suggest that the VLPs produced in *Drosophila* S2 cells could be a potential immunogen to be used in the development of a BLV vaccine that contributes, in conjunction with other control strategies, to reduce the transmission of the virus. *In vivo* studies are still needed to evaluate its ability to stimulate effective immune responses to evaluate its possible application in the rational design of an effective vaccine. Considering the different proven strategies for the development of a vaccine against BLV infection (18, 85), in addition to the characteristics of the presentation of antigens in a particulate form (22), the reduced biological risk associated to the use of non-infectious material, and the immunogenic features of proteins with N-glycosylation patterns rich in mannose, BLV VLPs produced in S2 *Drosophila* cells could be a potential immunogen. Future trials designed to evaluate immunogenicity and protective efficacy against viral challenges of this VLP platform in cattle may provide information on its potential advantages to be incorporated into new veterinary vaccine formulations.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD027973>. And I detected the following words and expressions: Global list: GenBank, Orbitrap, ProteomeXchange, UniProt.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NO-D and OP: conceptualization and designed the project. NO-D, LT-P, FC, MF, SB, AA, and NI: performed experiments. MP and RD: performed mass spectrometric measurements. FR: performed flow cytometry. DP: image processing of confocal microscopy and MET. NO-D: data analyses and original draft preparation. NO-D, LT-P, FC, MB, and OP: review and editing manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was partially funded by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC I+D 2014), Agencia Nacional de

Investigación e Innovación ANII (ALI_1_2016_2_129851), and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) and FOCEM - Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (COF 03/11). NO-D was recipient of a postgraduate fellow ship from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (POS_NAC_2015_1_109471) and a postgraduate fellow ship from Comisión Académica de Posgrado (cap) (BFPD_2020_1#28143834).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Advanced Bioimaging Unit at the Institut Pasteur Montevideo and Universidad de la República for their support and assistance in the present work. The authors gratefully acknowledge the Cell Biology Unit at the Institut Pasteur de Montevideo for their support and assistance in the present work.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fviro.2021.756559/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Kettmann R, Portetelle D, Mammerickx M, Cleuter Y, Dekegel D, Galoux M, et al. Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1976) 73:1014–8. doi: 10.1073/pnas.73.4.1014
- Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sánchez-Alcaraz MT, Boxus M, et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*. (2011) 3:1210–48. doi: 10.3390/v3071210
- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare). Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA J*. (2015) 13:4188. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4188.
- Barez P-Y, de Brogniez A, Carpentier A, Gazon H, Gillet N, Gutiérrez G, et al. Recent advances in BLV research. *Viruses*. (2015) 7:6080–8. doi: 10.3390/v7112929
- Emanuelson U, Scherling K, Pettersson H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Vet Med*. (1992) 12:121–31. doi: 10.1016/0167-5877(92)90075-Q
- Brunner MA, Lein DH, Dubovi EJ. Experiences with the New York state bovine leukosis virus eradication and certification program. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. (1997) 13:143–50. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30369-8
- Ott SL, Johnson R, Wells SJ. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med*. (2003) 61:249–62. doi: 10.1016/j.prevetmed.2003.08.003
- Frie MC, Coussens PM. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. (2015) 163:103–14. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.11.014
- Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Tremblay R. Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Prev Vet Med*. (2010) 94:54–64. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.11.012
- Fukuyama S, Kodama K, Hirahara T, Nakajima N, Takamura K, Sasaki O, et al. Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *J Vet Med Sci*. (1993) 55:99–106. doi: 10.1292/jvms.55.99
- Parfanovich MI, Zhdanov VM, Lazarenko AA, Nömm EM, Simovart YA, Parakin VK, et al. The possibility of specific protection against bovine leukaemia virus infection and bovine leukaemia with inactivated blv. *Br Vet J*. (1983). doi: 10.1016/S0007-1935(17)30537-7
- Altaner C, Ban J, Altanerova V, Janik V. Protective vaccination against bovine leukaemia virus infection by means of cell-derived vaccine. *Vaccine*. (1991) 9:889–95. doi: 10.1016/0264-410X(91)90009-U
- Merza M, Söber J, Sundquist B, Toots I, Morein B. Characterization of purified gp 51 from bovine leukemia virus integrated into iscom. *Arch Virol*. (1991) 120:219–31. doi: 10.1007/BF01310477
- Kabeya H, Ohashi K, Ohishi K, Sugimoto C, Amanuma H, Onuma M. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine*. (1996) 14:1118–22. doi: 10.1016/0264-410X(96)00047-3
- Kerkhofs P, Gatot JS, Knapen K, Mammerickx M, Burny A, Portetelle D, et al. Long-term protection against bovine leukaemia virus replication in cattle and sheep. *J Gen Virol*. (2000) 81:957–63. doi: 10.1099/0022-1317-81-4-957
- Usui T, Konnai S, Tajima S, Watarai S, Aida Y, Ohashi K, et al. Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. *J Vet Med Sci*. (2003). doi: 10.1292/jvms.65.1201
- Reichert M, Cantor GH, Willems L, Kettmann R. Protective effects of a live attenuated bovine leukaemia virus vaccine with deletion in the R3 and G4 genes. *J Gen Virol*. (2000) 81:965–9. doi: 10.1099/0022-1317-81-4-965
- Abdala A, Alvarez I, Brossel H, Calvino L, Carignano H, Franco L, et al. BLV: lessons on vaccine development. *Retrovirology*. (2019) 16:26. doi: 10.1186/s12977-019-0488-8
- Rodríguez SM, Gutiérrez G, Gillet N, Trono K, Willems L, A. recombinant attenuated candidate vaccine that efficiently and persistently protects against bovine leukemia virus in herds. *Retrovirology*. (2014) 2014:10. doi: 10.1186/1742-4690-11-S1-O10
- Nooraie S, Bahrulolom H, Sadat Hoseini Z, Katalani C, Hajizade A, Andrew EJ, et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Nanobiotechnol J*. (2021) 19:59. doi: 10.1186/s12951-021-00806-7

21. Jeong H, Seong BL. Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections. *Microbiol J.* (2017) 55:220–30. doi: 10.1007/s12275-017-7058-3
22. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine.* (2012) 31:58–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083
23. Pushko P, Pumpens P, Grens E. Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology.* (2013) 56:141–65. doi: 10.1159/000346773
24. Crisci E, Bárcena J, Montoya M. Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet Immunol Immunopathol.* (2012) 48:211–25. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.04.026
25. Liu F, Ge S, Li L, Wu X, Liu Z, Wang Z. Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. *Res Vet Sci.* (2012) 93:553–9. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.10.018
26. Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *N Biotechnol.* (2017) 10:174–180. doi: 10.1016/j.nbt.2017.07.010
27. de Jongh AW, Salgueiro S, Dyring C. The use of *Drosophila* S2 cells in R&D and bioprocessing. *Pharm Bioprocess.* (2013). 1:197–213. doi: 10.4155/pbp.13.18
28. Yang L, Song Y, Li X, Huang X, Liu J, Ding H, et al. HIV-1 virus-like particles produced by stably transfected *Drosophila* S2 cells: a desirable vaccine component. *Viol J.* (2012) 2012:11. doi: 10.1128/JVI.07164-11
29. Park EM, Park SW, Lee YJ, Lee WJ, Choi W. Production of Ebola virus-like particles in *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells. *J Virol Methods.* (2018) 261:156–9. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.08.016
30. Lee JM, Chung HY, Kim KI, Yoo KH, Hwang-Bo J, Chung IS, et al. Synthesis of double-layered rotavirus-like particles using internal ribosome entry site vector system in stably-transformed *Drosophila melanogaster*. *Biotechnol Lett.* (2011) 33:41–6. doi: 10.1007/s10529-010-0390-x
31. Bai L, Sato H, Kubo U, Wada S, Aida Y, et al. CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection. *FASEB J.* (2019) 2019:666958. doi: 10.1101/666958
32. Bai L, Takeshima SN, Isogai E, Kohara J, Aida Y. Novel CD8+ cytotoxic T cell epitopes in bovine leukemia virus with cattle. *Vaccine.* (2015) 10:128. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.10.128
33. Freed EO. HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology.* (1998) 251:1–15. doi: 10.1006/viro.1998.9398
34. Johnston ER, Albritton LM, Radke K. Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of bovine leukemia virus surface protein. *Viol J.* (2002) 76:10861–72. doi: 10.1128/JVI.76.21.10861-10872.2002
35. de Brogniez A, Mast J, Willems L. Determinants of the bovine leukemia virus envelope glycoproteins involved in infectivity, replication and pathogenesis. *Viruses.* (2016) 8:88. doi: 10.3390/v8040088
36. Jacobs E, Gheysen D, Thines D, Francotte M, de Wilde M. The HIV-1 Gag precursor Pr55gag synthesized in yeast is myristoylated and targeted to the plasma membrane. *Gene.* (1989) 1989:90093. doi: 10.1016/0378-1119(89)90093-0
37. Kakker NK, Mikhailov MV, Nermut MV, Burny A, Roy P. Bovine leukemia virus Gag particle assembly in insect cells: formation of chimeric particles by domain-switched leukemia/lentivirus Gag polyprotein. *Virology.* (1999) 265:308–18. doi: 10.1006/viro.1999.0007
38. Mager A, Masengo R, Mammerickx M, Letesson J-J. T cell proliferative response to bovine leukaemia virus (BLV): identification of T cell epitopes on the major core protein (p24) in BLV-infected cattle with normal haematological values. *J Gen Virol.* (1994) 75:2223–31. doi: 10.1099/0022-1317-75-9-2223
39. Otsuki H, Takeshima S, Aida Y. Generation of virus-like particle as a vaccine strategy against bovine leukemia virus. *Retrovirology.* (2015) 12:P47. doi: 10.1186/1742-4690-12-S1-P47
40. Wang H, Norris KM, Mansky LM. Analysis of bovine leukemia virus Gag membrane targeting and late domain function. *Viol J.* (2002) 76:8485–93. doi: 10.1128/JVI.76.16.8485-8493.2002
41. Hertig C, Pye AD, Hyatt AD, Boyle DB. Retrovirus-like particles produced by vaccinia viruses expressing gag-pro-pol region genes of bovine leukaemia virus. *J Gen Virol.* (1994) 75:2213–21. doi: 10.1099/0022-1317-75-9-2213
42. González-Domínguez I, Gutiérrez-Granados S, Cervera L, Gòdia F, Domingo N. Identification of HIV-1-based virus-like particles by multifrequency atomic force microscopy. *Biophys J.* (2016) 111:1173–9. doi: 10.1016/j.bpj.2016.07.046
43. Tagliamonte M, Visciano ML, Tornesello ML, De Stradis A, Buonaguro FM, Buonaguro L. HIV-Gag VLPs presenting trimeric HIV-1 gp140 spikes constitutively expressed in stable double transfected insect cell line. *Vaccine.* (2011) 29:4913–22. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.004
44. Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Martínez M, Blanco J, Gòdia F, Mercedes Segura M. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *Biotechnol J.* (2013) 166:152–65. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.05.001
45. Gutiérrez-Granados S, Cervera L, Gòdia F, Carrillo J, Mercedes Segura M. Development and validation of a quantitation assay for fluorescently tagged HIV-1 virus-like particles. *J Virol Methods.* (2013) 193:85–95. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.05.010
46. González-Domínguez I, Puente-Massaguer E, Cervera L, Gòdia F. Quality assessment of virus-like particles at single particle level: a comparative study. *Viruses.* (2020) 12:1–24. doi: 10.3390/v12020223
47. Lynch A, Meyers AE, Williamson AL, Rybicki EP. Stability studies of HIV-1 Pr55gag virus-like particles made in insect cells after storage in various formulation media. *Viol J.* (2012) 9:1. doi: 10.1186/1743-422X-9-210
48. Valley-Omar Z, Ann Meyers E, Enid Shephard G, Williamson AL, Edward Rybicki P. Abrogation of contaminating RNA activity in HIV-1 Gag VLPs. *Viol J.* (2011) 8:1–12. doi: 10.1186/1743-422X-8-462
49. Steppert P, Burgstaller D, Klausberger M, Berger E, Aguilar P, Tobias Schneider A, et al. Purification of HIV-1 gag virus-like particles and separation of other extracellular particles. *J Chromatogr A.* (2016) 1455:93–101. doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.053
50. González-Reyes L, Ruiz-Argüello MB, García-Barreno B, Calder L, López JA, Albar JP, et al. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2001) 98:9859–64. doi: 10.1073/pnas.151098198
51. Sage D, Donati L, Soulez F, Fortun D, Schmit G, Seitz A, et al. DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods.* (2017) 115:28–41. doi: 10.1016/j.jymeth.2016.12.015
52. Beck A, Teboulle M. A fast iterative shrinkage-thresholding algorithm. *SIAM J Imaging Sci.* (2009) 2:183–202. doi: 10.1137/080716542
53. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Deepti Kundu J, et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47:D442–50. doi: 10.1093/nar/gky1106
54. Callebaut I, Vonèche V, Mager A, Fumière O, Krchnak V, Merza M, et al. Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *Viol J.* (1993) 67:5321–7. doi: 10.1128/jvi.67.9.5321-5327.1993
55. Gelderblom HR, Reupke H, Pauli G. Loss of envelope antigens of htlv-III/LAV, a factor in aids pathogenesis? *Lancet.* (1985) 2:1016–7. doi: 10.1016/S0140-6736(85)90570-7
56. McKeating JA, McKnight A, Moore JP. Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization. *Viol J.* (1991) 74:860. doi: 10.1128/jvi.65.2.852-860.1991
57. Pan Y, Ma B, Keskin O, Nussinov R. Characterization of the conformational state and flexibility of HIV-1 glycoprotein gp120 core domain. *J Biol Chem.* (2004) 279:30523–30. doi: 10.1074/jbc.M404364200
58. Rutten L, Lai YT, Blokland S, Truan D, Ilona Bisschop JM, Nika Strokappe M, et al. A universal approach to optimize the folding and stability of prefusion-closed HIV-1 envelope trimers. *Cell Rep.* (2018) 23:584–95. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.061
59. Sliopen K, Woo Han B, Bontjer I, Mooij P, Garces F, Behrens AJ, et al. Structure and immunogenicity of a stabilized HIV-1 envelope trimer based on a group-M consensus sequence. *Nat Commun.* (2019) 10:1–16. doi: 10.1038/s41467-019-10262-5
60. Rawi R, Rutten L, Lai YT, Adam Olia S, Blokland S, Juraszek J, et al. Automated design by structure-based stabilization and consensus repair to

- achieve prefusion-closed envelope trimers in a wide variety of HI strains. *Cell Rep.* (2020) 33:108432. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108432
61. Wang Q, Ma B, Liang Q, Zhu A, Wang H, Fu L, et al. Stabilized diverse HIV-1 envelope trimers for vaccine design. *Emerg Microbes Infect.* 9:775–86. doi: 10.1080/22221751.2020.1745093
 62. Gonelli CA, King HAD, Mackenzie C, Sonza S, Center RJ, Damian F, et al. Immunogenicity of HIV-1-based virus-like particles with increased incorporation and stability of membrane-bound Env. *Vaccines.* (2021) 9:239. doi: 10.3390/vaccines9030239
 63. Tomé Poderti L. *Estudio de la interacción entre el virus de la leucemia bovina y la célula hospedera. Universidad de la República (Uruguay).* Facultad de Ciencias - PEDECIBA (2014). Available online at: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/24048> (accessed 15 October 2021).
 64. Wang BZ, Liu W, Kang SM, Alam M, Huang C, Ye L, et al. Incorporation of high levels of chimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins into virus-like particles. *Virology.* (2007) 361:10869–78. doi: 10.1016/j.virol.2007.05.027
 65. Andrew W, Evans R, Jumper J, Kirkpatrick J, Sifre L, Green T, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature.* (2020) 577:706–10. doi: 10.1038/s41586-019-1923-7
 66. Künnapuu J, Björkgren I, Shimmi O. The Drosophila DPP signal is produced by cleavage of its proprotein at evolutionary diversified furin-recognition sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2009). doi: 10.1073/pnas.0809885106
 67. Kido H, Niwa Y, Beppu Y, Towatari T. Cellular proteases involved in the pathogenicity of enveloped animal viruses, human immunodeficiency virus, influenza virus A and sendai virus. *Adv Enzyme Regul.* (1996) 36:325–47. doi: 10.1016/0065-2571(95)00016-X
 68. Seidah NG, Pasquato A, Andreo U. How do enveloped viruses exploit the secretory proprotein convertases to regulate infectivity and spread? *Viruses.* (2021) 13:1229. doi: 10.3390/v13071229
 69. Li SW, Wright M, Healey JF, Hutchinson JM, O'Rourke S, Mesa KA, et al. Gene editing in CHO cells to prevent proteolysis and enhance glycosylation: Production of HIV envelope proteins as vaccine immunogens. *PLoS ONE.* (2020) 15:233866. doi: 10.1371/journal.pone.0233866
 70. Rendić D, Wilson IBH, Paschinger K. The glycosylation capacity of insect cells. *Croatica Chemica Acta.* (2008) 81:7–21. doi: 10.1002/chin.200831267
 71. Wilson IBH. Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Curr Opin Struct Biol.* (2002) 12:569–77. doi: 10.1016/S0959-440X(02)00367-6
 72. Rizzo G, Forti K, Serroni A, Cagiola M, Baglivo S, Scoccia E, et al. Single N-glycosylation site of bovine leukemia virus SU is involved in conformation and viral escape. *Vet Microbiol.* (2016) 197:21–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.10.024
 73. de Brogniez A, Bouzar AB, Jacques JR, Cosse JP, Gillet N, Callebaut I, et al. Mutation of a single envelope N-linked glycosylation site enhances the pathogenicity of bovine leukemia virus. *Virology.* (2015) 531:15. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.015
 74. Urbanowicz RA, Wang R, Schiel JE, Keck ZY, Kerzic MC, Lau P, et al. Antigenicity and immunogenicity of differentially glycosylated hepatitis C virus E2 envelope proteins expressed in mammalian and insect cells. *Virology.* (2019) 531:18. doi: 10.1016/j.virol.2019.03.018
 75. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology.* (2007) 4:18. doi: 10.1186/1742-4690-4-18
 76. Reiter K, Aguilar PP, Wetter V, Steppert P, Tover A, Jungbauer A. Separation of virus-like particles and extracellular vesicles by flow-through and heparin affinity chromatography. *J Chromatogr A.* (2019) 1612:35. doi: 10.1016/j.chroma.2018.12.035
 77. Cherney TM, Schultz RD. Viral status and antibody response in cattle inoculated with recombinant bovine leukemia virus-vaccinia virus vaccines after challenge exposure with bovine leukemia virus-infected lymphocytes. *Am J Vet Res.* (1996) 57:812–8.
 78. Onuma M, Hodatsu T, Yamamoto S, Higashihara M, Masu S, Mikami T, et al. Protection by vaccination against bovine leukemia virus infection in sheep. *Am J Vet Res.* (1984) 45:1212–5.
 79. Ohishi K, Kabeya H, Amanuma H, Onuma M. Peptide-based bovine leukemia virus (BLV) vaccine that induces BLV-Env specific Th-1 type immunity. *Leukemia.* (1997) 11(Suppl.3):223–6.
 80. Okada K, Sonoda K, Koyama M, Yin S, Ikeda M, Goryo M, et al. Delayed-type hypersensitivity in sheep induced by synthetic peptides of bovine leukemia virus encapsulated in mannan-coated liposome. *J Vet Med Sci.* (2003) 65:515–8. doi: 10.1292/jvms.65.515
 81. Portetelle D, Limbach K, Burny A, Mammerickx M, Desmettre P, Riviere M, et al. Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukaemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection. *Vaccine.* (1991) 9:194–200. doi: 10.1016/0264-410X(91)90153-W
 82. Ohishi K, Suzuki H, Yasutomi Y, Onuma M, Okada K, Numakunai S, et al. Augmentation of bovine leukemia virus (BLV)-specific lymphocyte proliferation responses in ruminants by inoculation with BLV env-recombinant vaccinia virus: their role in the suppression of BLV replication. *V. Microbiol Immunol.* (1992) 36:1317–23. doi: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02133.x
 83. Von Beust BR, Brown WC, Estes DM, Zarlenga DS, McElwain TF, Palmer GH. Development and in vitro characterization of recombinant vaccinia viruses expressing bovine leukemia virus gp51 in combination with bovine IL4 or IL12. *Vaccine.* (1999) 17:384–95. doi: 10.1016/S0264-410X(98)00208-4
 84. Gutiérrez G, Rodríguez SM, Vilor A, Gillet N, DeBrogniez A, Trono K, et al. An efficient vaccine against bovine leukemia virus. *Retrovirology.* (2015) 12:1. doi: 10.1186/1742-4690-12-S1-P3
 85. Gutiérrez G, Rodríguez SM, de Brogniez A, Gillet N, Golime R, Burny A, et al. Vaccination against δ -retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses.* (2014) 6:2416–27. doi: 10.3390/v6062416

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Olivero-Deibe, Tomé-Poderti, Carrión, Bianchi, Fló, Prieto, Rammauro, Addiego, Ibañez, Portela, Duran, Berois and Pritsch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.