



Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

# **Búsqueda de inhibidores del ensamblaje de la cápside de retrovirus de importancia en Salud Animal**

Natalia Sierra

Orientador: Dr. Guzmán Álvarez

Co-orientadora: Lic. Lía Randall

Laboratorio de Moléculas Bioactivas

CENUR Litoral Norte

Universidad de la República

**2015**

## ***Agradecimientos***

***Dra. Ana Denicola***, Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias por permitir usar su laboratorio para realizar los experimentos.

***Federico Carrión, Dr. Gonzalo Obal y Dr. Otto Pritsch***, Unidad de Biofísica de Proteínas, IPMont, por donarnos la p24 pura para los experimentos.

***Dra. Mercedes González***, Grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, por el uso de la Quimioteca

***Dr. Christophe Guillon***, Biocristallographie et Biologie Structurale des Cibles Thérapeutiques Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université Lyon I, Lyon, France por el apoyo con CA de VIF.

***ANII Beca de iniciación INI\_X\_2013\_1\_101141*** Búsqueda de inhibidores del ensamblaje de la cápside del Virus de la Leucosis Bovina.

***PROGRAMA ECOS*** Proyectos conjuntos de investigación científica Uruguay – Francia Investigación y Desarrollo de fármacos antivirales para el Virus de la Inmunodeficiencia.

*A mis tutores Guzmán y Lía*

*A mi madre por su apoyo incondicional y por ser el ejemplo de mujer luchadora e independiente.*

*A Rodrigo por el cariño, la confianza y por darme en todo momento sus palabras de aliento.*

*A mis hermanos Adri, Moni, Maité y Joaco.*

*A mi abuelo Lito, mi abuela Esther, mis tíos y primos.*

*A Rafael por todo el apoyo brindado.*

*A Jose, Ramiro y Caro por ser como una segunda familia.*

*A todos mis amigos por estar siempre presentes.*

*A Karen y a Naty amigas y compañeras de carrera, por ser la mejor de las compañías en esas largas jornadas de estudio y por los exámenes salvados juntas.*

*A todos los que integran los Laboratorios de Físicoquímica Biológica, Ezimología y Química Orgánica.*

*Y a todas aquellas personas que conocí en estos años de carrera.*

## **Índice**

<b>Resumen</b>	<b>4</b>
<b>Introducción y antecedentes</b>	<b>6</b>
<b>Objetivos</b>	<b>15</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>16</b>
<b>Resultados y discusión</b>	<b>19</b>
<b>Conclusiones y perspectivas</b>	<b>33</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>34</b>

## Resumen

Los retrovirus son una preocupación importante de salud pública tanto en seres humanos como en animales. En los seres humanos, se estima que más de 35 millones de personas están infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Las infecciones retrovirales también afectan al ganado y los animales domésticos. Por ejemplo, los gatos domésticos son susceptibles a la infección con virus de inmunodeficiencia felina (VIF), que causa una enfermedad similar al SIDA. La prevalencia de la infección por VIF puede alcanzar hasta el 30% de los gatos domésticos en los países desarrollados. El ganado es afectado por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB), agente causal de la Leucemia Bovina Enzoótica. Infecta al ganado vacuno en todo el mundo, provocando grandes pérdidas económicas, con impacto en la industria lechera. En Uruguay se estima que más del 60% del ganado se encuentra infectado con este virus. Contra estas infecciones, que representan un importante problema económico y de salud, no existen vacunas aún. Existen múltiples medicamentos antivirales que logran la sobrevida de las personas infectadas, pero estos no son de uso veterinario. Por otra parte, dada la variabilidad continua de los retrovirus, constantemente se generan nuevas variantes virales resistentes a estos medicamentos. Por todo esto se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de estas infecciones. Existen varios blancos moleculares para el diseño de fármacos antivirales, tales como la transcriptasa inversa, proteasas, integrasas, la proteína de la cápside (CA) y la envoltura viral. Los fármacos con actividad antiviral que existen y se utilizan para tratar la infección por retrovirus se dirigen principalmente a inhibir la transcriptasa inversa o la proteasa. Estas moléculas tienen una gran complejidad sintética y estructural, que los hacen poco aplicables para su uso veterinario. De todos los blancos moleculares, las proteínas de cápside son las más versátiles al momento de la búsqueda de moléculas inhibidoras. Las interacciones intermoleculares entre las proteínas de la cápside son esenciales para la formación de partículas virales infecciosas, haciendo a CA un blanco interesante para el desarrollo de compuestos antivirales. En este trabajo se puso a punto una técnica sencilla de búsqueda de moléculas inhibidoras de la polimerización de la CA de VLB y VIF, utilizando la propiedad de polimerización que tiene CA, empleando espectroscopía UV-visible para

seguir el ensamblaje de ambas cápsides. Se ensayó además una veintena de moléculas para validar la metodología.

## **Introducción y antecedentes.**

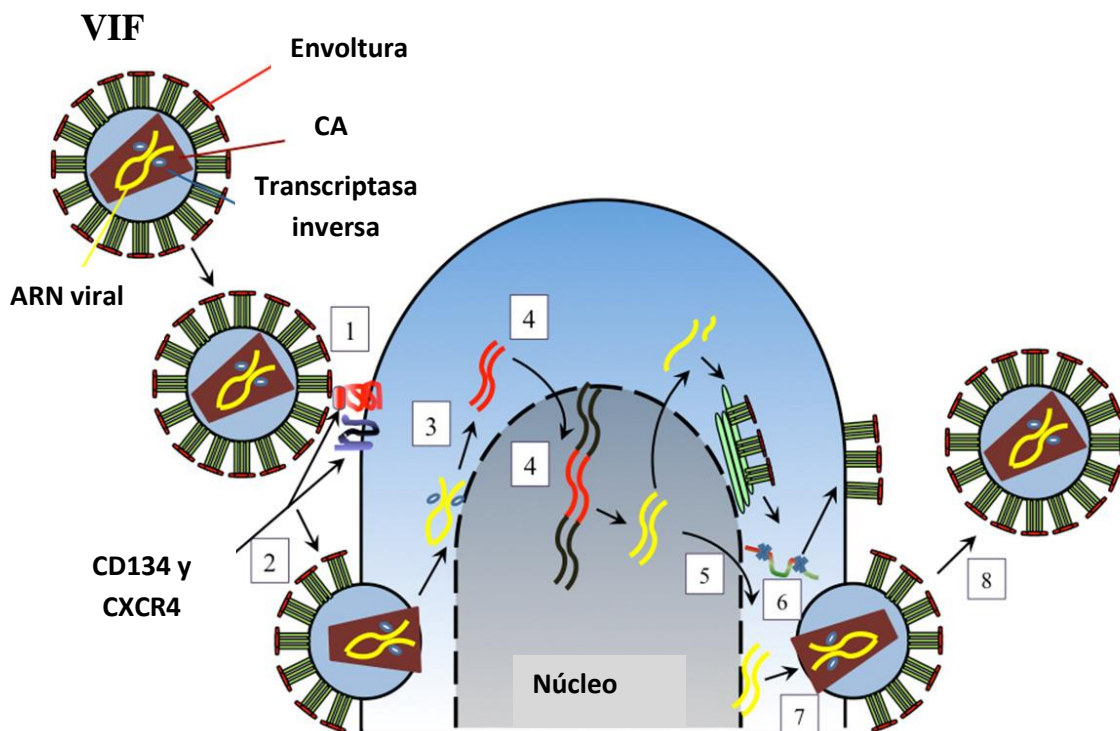
Los retrovirus son una preocupación importante de salud pública en los seres humanos y los animales. En los seres humanos, se estima que más de 35 millones de personas están infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), según el informe de ONU-SIDA 2013<sup>1</sup>. Las infecciones retrovirales también afectan al ganado y los animales domésticos. Por ejemplo, el ganado es afectado por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB). VLB es el agente causal de la Leucemia Bovina Enzoótica<sup>2</sup>. Infecta al ganado vacuno en todo el mundo, provocando grandes pérdidas económicas<sup>3,4,5</sup>. La infección con VLB está muy extendida en la industria láctea, por lo que la mayoría de los productores tratan de forma activa de reducir la incidencia dentro de sus rebaños mejorando las técnicas de manipulación. Sin embargo se estima que la infección con VLB costaría a la industria láctea cientos de millones de dólares anuales y esto es probablemente una estimación conservadora<sup>6</sup>.

VLB no causa molestias al animal o graves patologías a menos que la infección progrese a leucemia o linfoma. Sin embargo, gran parte de la investigación apoya la idea de que la infección por VLB causa función inmunológica anormal generalizada. La infección con VLB puede afectar las células tanto del sistema inmune innato como del adaptativo y alterar el correcto funcionamiento de las células no infectadas<sup>7</sup>. La transmisión viral se puede dar de forma vertical, aproximadamente 15% de los casos (transplacentaria o vía calostro) u horizontal, aproximadamente 85% de los casos (contacto con sangre infectada, mucus, tejidos, semen o insectos hematófagos)<sup>8</sup>.

En Uruguay se estima que más del 60% del ganado se encuentra infectado con este virus, implicando un altísimo riesgo económico<sup>9</sup>. La agroindustria láctea en Uruguay implica económicamente el 9,3% del PBI agropecuario y 7,3% del total de exportaciones. Se estima además que en años futuros las exportaciones ganaderas se exigirán libres de VLB, por lo cual deben generarse alternativas de tratamiento diferentes del sacrificio.

Los gatos domésticos (así como los felinos salvajes) son susceptibles a la infección con virus de inmunodeficiencia felina (VIF), que causa una enfermedad similar al SIDA. La prevalencia de la infección por VIF puede alcanzar hasta el 30% de los gatos

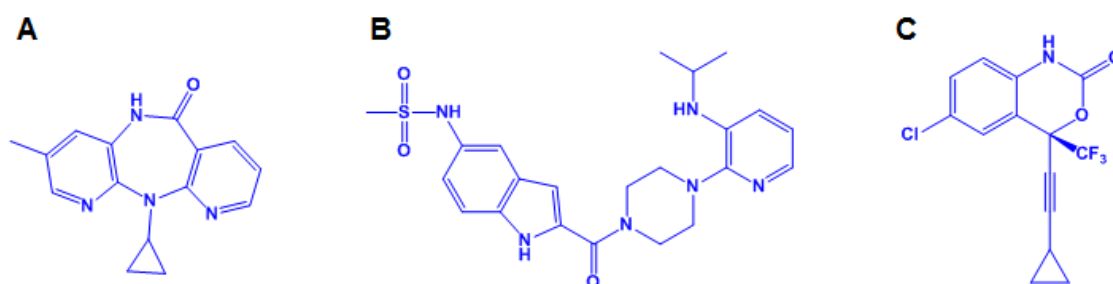
domésticos en los países desarrollados<sup>10,11</sup>. Debido a la marcada similitud entre VIF y VIH en la organización genómica, estructura del virus, la replicación del virus y la patogénesis de la enfermedad, la infección de los gatos con VIF es una herramienta útil para estudiar y desarrollar nuevos fármacos y vacunas para el VIH. Los medicamentos antirretrovirales ampliamente estudiados en la infección por el VIH se han centrado en diferentes etapas del ciclo de replicación del virus: (1) la inhibición de la entrada del virus en las células susceptibles al anclaje a los receptores de superficie celular y co-receptores, (2) inhibición de la fusión de la membrana del virus con la membrana celular, (3) bloqueo de la transcripción inversa de ARN genómico viral, (4) interrupción de la translocación nuclear y la integración del ADN viral en los genomas del hospedero, (5) prevención de procesamiento de transcripción viral y la exportación nuclear, y (6) inhibición de ensamblaje del virión y la maduración (Figura 1).



**Figura 1.** Ejemplo de ciclo de replicación de un retrovirus (VIF). Diagrama donde se muestran los sitios potenciales de acción de la terapia antirretroviral: (1) anclaje a los receptores de membrana, (2) fusión con la membrana celular, (3) transcriptasa inversa, (4) translocación al núcleo e integración al genoma celular, (5) transcripción viral y exportación, (6) proteasa viral y procesamiento proteico, (7) ensamblaje del virión y maduración; (8) liberación de la partícula viral. (Tomado de Mohammadi H, 2012)<sup>12</sup>

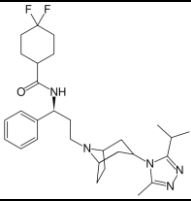
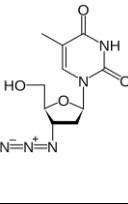
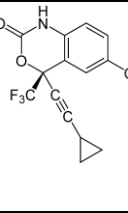
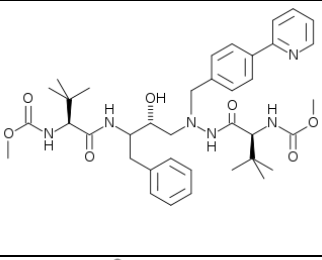
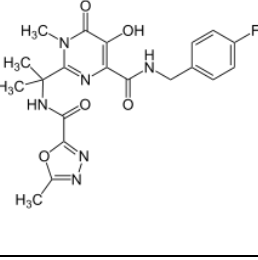
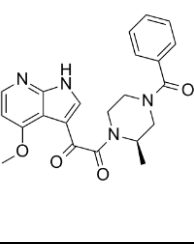
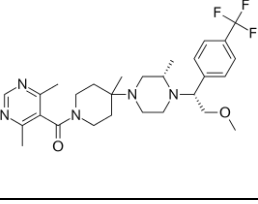


Contra estas infecciones, que representan un importante problema económico y de salud, no existen vacunas aún<sup>13</sup>. Existen múltiples medicamentos antivirales que logran la sobrevivencia de las personas infectadas, pero estos no son de uso veterinario (Figura 2). Además, por la variabilidad continua de los retrovirus, constantemente se generan nuevas variantes virales resistentes a estos medicamentos<sup>14,15</sup>. Por todo lo anteriormente mencionado, se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de estas infecciones virales (tanto por la falta de fármacos específicos de uso veterinario, como por la generación constante de resistencia). Existen varios blancos moleculares para el diseño de fármacos antivirales, tales como la transcriptasa inversa, proteasas, integrasas, la proteína de la cápside (CA) y la envoltura viral (Tabla 1)<sup>16,17,18,19,20</sup>. Los fármacos con actividad antiviral que existen y se utilizan para tratar la infección por retrovirus se dirigen principalmente a inhibir la transcriptasa inversa o la proteasa (Figura 2 y Tabla 1)<sup>21,22</sup>. Estas moléculas tienen una gran complejidad sintética y estructural, que las hacen poco aplicables para su uso en el tratamiento de animales y resulta costoso para las personas.

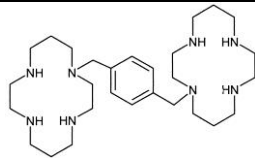
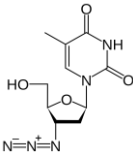
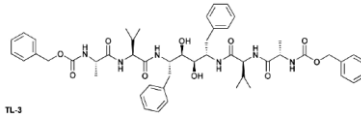
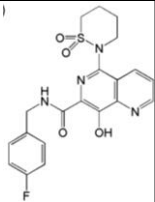
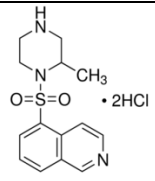
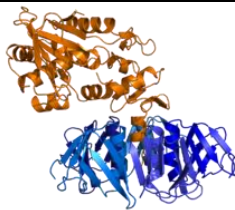


**Figura 2.** Agentes antirretrovirales utilizados en la clínica actualmente inhibidores de la transcriptasa inversa. A) Mesylato de delaviridina, B) Nevirapina, C) Efavirenz.

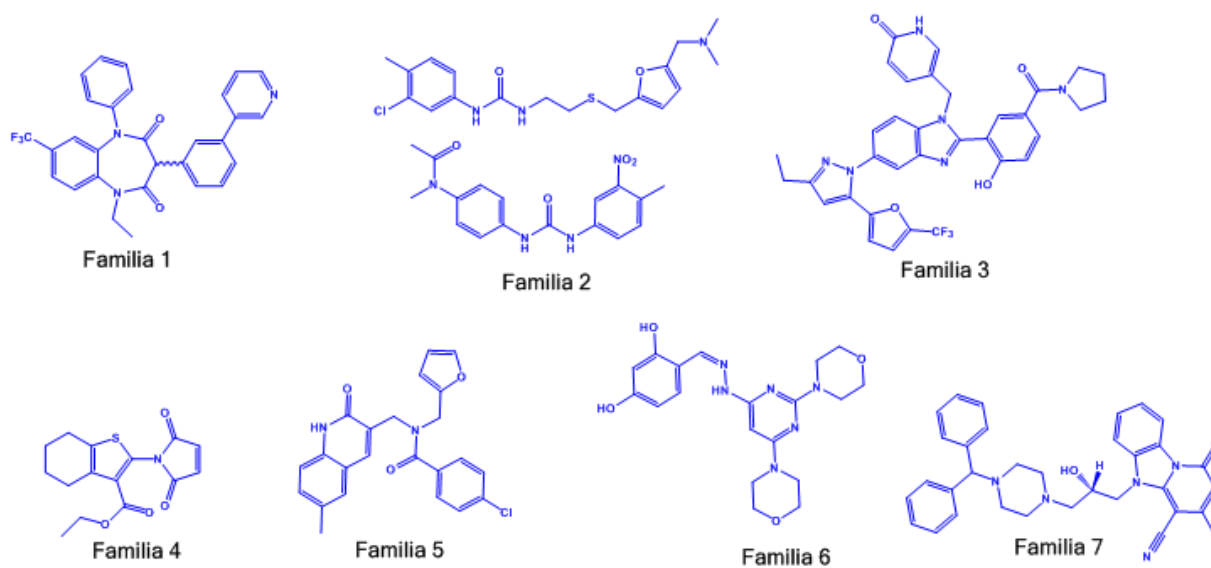
**Tabla 1.** Compuestos antirretrovirales de uso comercial y sus mecanismos para VIH.

Blanco	Agentes	Estructura
Entrada del virus	Maraviroc (antagonista de CCR5), Enfuvirtide (inhibidor de la fusión)	
Trascriptasa inversa (análogo de nucleótidos)	Zidovudine, Stavudine, Lamivudine, Didanosine, Abacavir, Emtricitabine Tenofovir disoproxil fumarate	
Trascriptasa inversa (No-análogo de nucleótidos)	Efavirenz, Nevirapine, Delavirdine, Etravirine Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir, Saquinavir	
Proteasa	Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Lopinavir	
Integrasa	Raltegravir	
Anclaje a CD4	PRO-542, BMS-806	
Receptor de quimiocinas	Vicriviroc, PRO 140	

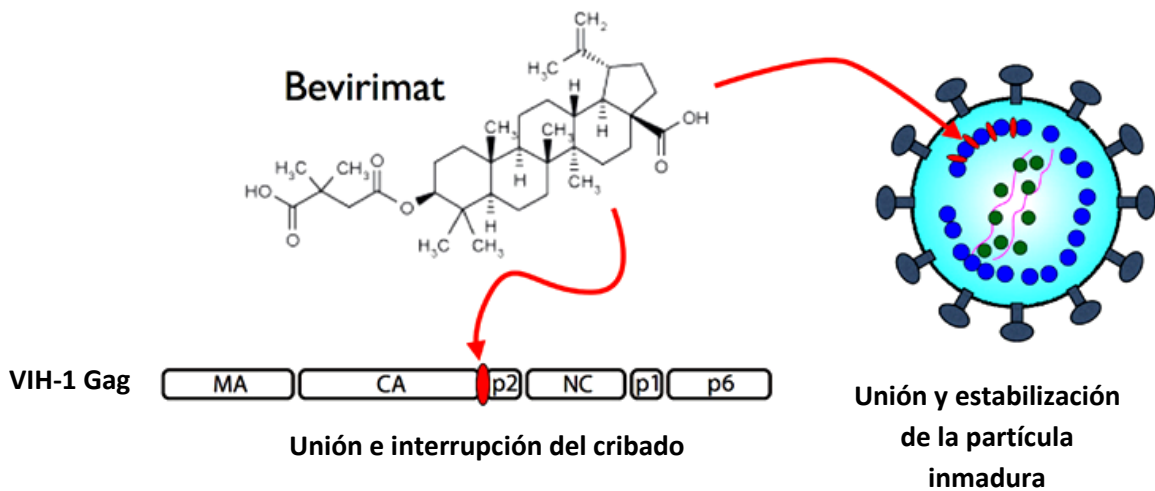
**Tabla 2.** Compuestos con actividad antiviral en VIF y VLB<sup>11</sup>.

Blanco	Agente	Datos biológicos	Estructura
CXCR4	AMD3100	Reducción de la replicación de VIF <i>in vitro</i> y tolerado por los gatos	
Transcriptasa inversa	Zidovudine, Stavudine, PMEA, Dideoxycytidine, Fozivudine, WHI-07 (derivative of zidovudine), Stampidine, Lamivudine	Previene la replicación viral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , disminuye la carga viral en gatos infectados crónicos con VIF, tolerado en gatos	
Proteasa	TL-3	Inhibición de la replicación viral por VIF. Tolerado <i>in vivo</i> con reducido efecto neurodegenerativo	
Integrasa	L-870810	Reducción de la replicación de VIF <i>in vitro</i>	
VLB (Protein Kinase C)	1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride	Inhibición de la expresión de VLB medido por antígenos gp51 o p24Pag en células PBMC infectadas <sup>23</sup>	
VLB (desconocido)	Shiga Toxin 1	Inhibición de la expresión de P24 (CA) de VLB en células PBMC infectadas <sup>24</sup>	

De todos los blancos moleculares, las proteínas de la cápside son las más versátiles al momento de buscar moléculas bioactivas, dado que estas se pueden obtener en grandes cantidades y el seguimiento del proceso de ensamblaje no necesita de sustratos sofisticados. Las interacciones intermoleculares entre las proteínas de la cápside son esenciales para la formación de partículas retrovirales infecciosas, haciendo a CA un blanco interesante para el desarrollo de compuestos antivirales<sup>25</sup>. De hecho, si los compuestos inhiben el ensamblaje de la cápside, bloquean la formación de nuevas partículas virales y por lo tanto limitan la propagación de la infección. Por otra parte, CA se puede usar en ensayos de cribado (*screening*) de alto rendimiento sin necesidad de utilizar técnicas complicadas y sustratos costosos<sup>26</sup>. Existe un extenso trabajo de inhibidores de la formación de la cápside de VIH que validan su uso como agentes antivirales (Figura 3)<sup>27,28,29,30,31,32,33</sup>.

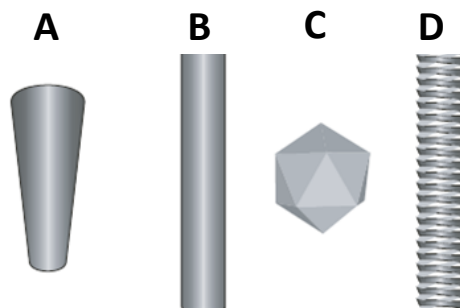


**Figura 3.** Familias de compuestos identificados como inhibidores de la formación de la cápside de VIH.



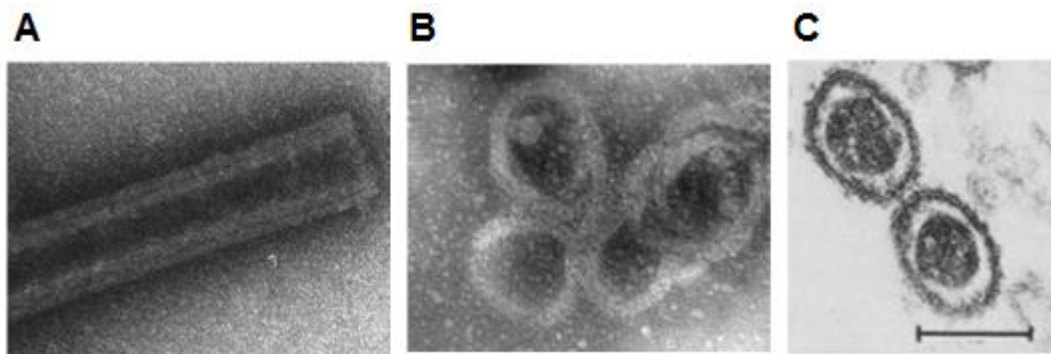
**Figura 4.** Esquema del mecanismo de acción de uno de los antivirales (Bevirimat) con blanco en el ensamblaje de la partícula viral (Tomado de Mohammadi H, 2012)<sup>12</sup>.

Las funciones de la cápside incluyen la protección del genoma y el reconocimiento por parte de la célula huésped donde será liberado el genoma. Existe cierta versatilidad en las cápsides virales debido a que presentan una estabilidad tal que permite la supervivencia del virión en el medio extracelular, y a su vez tienen la capacidad de modificar su conformación una vez dentro de la célula huésped para la liberación del genoma. La cápside está constituida por muchas moléculas de naturaleza proteica, ya sea de una misma especie o de diversas, que se organizan de modo tal de formar estructuras simétricas (Figura 5).

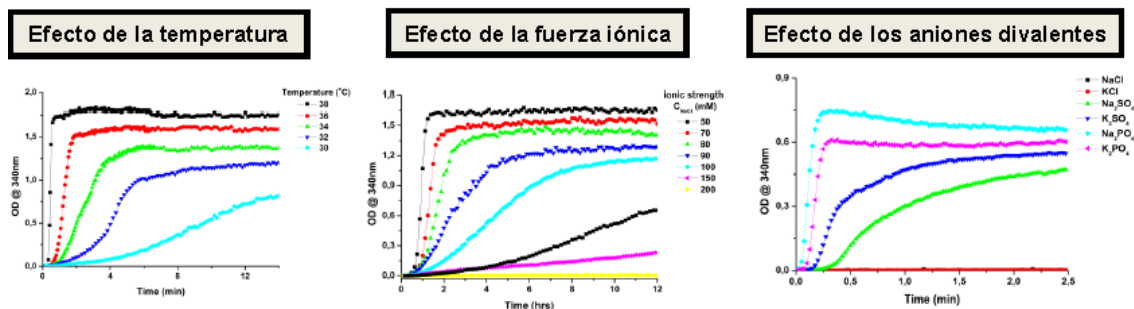


**Figura 5.** Esquema de las posibles estructuras simétricas que puede adoptar la cápside viral. A) Cono, B) tubo, C) icosaedro, D) hélice (Tomado de Briggs J. et al, 2006)<sup>34</sup>.

La cápside de VLB, según estudios biofísicos recientes, puede adoptar formas tubulares o esferoides *in vitro* (Figura 6). Además, la CA existe como monómero en solución a bajas temperaturas. La polimerización *in vitro* es dependiente de múltiples factores que hacen que esta forme polímeros de gran tamaño. La polimerización de CA es dependiente de la concentración, la fuerza iónica, la presencia de sales divalentes y la temperatura (Figura 7)<sup>35</sup>.

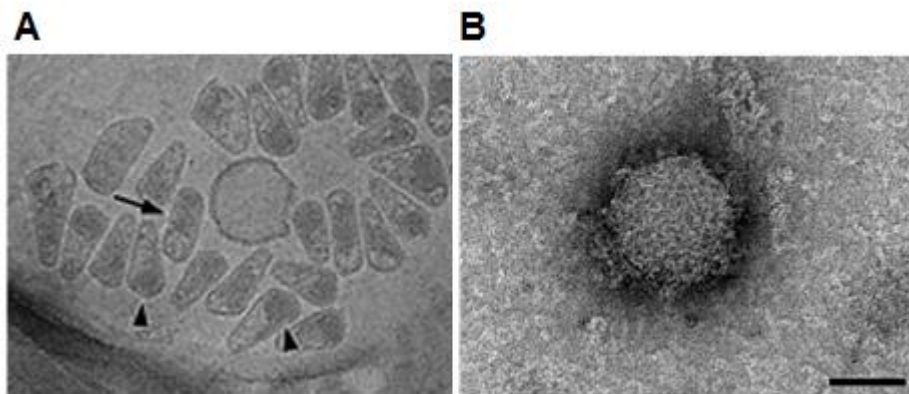


**Figura 6.** Micrografías electrónicas (ME) que muestran A) la forma tubular de la cápside de VLB, B) la forma ovoide y C) la cápside nativa (Tomado de Obal G. et al, 2015)<sup>35</sup>.



**Figura 7.** Efecto de la temperatura, fuerza iónica e iones divalentes en la polimerización de CA. Cuando la temperatura se acerca a la fisiológica de la vaca, se promueve la polimerización, al igual que el aumento de los aniones divalentes como fosfatos y sulfatos (Tomado de Obal G. 2014)<sup>36</sup>.

La cápside de VIF así como la de otros lentivirus, adopta una simetría cónica formada por alrededor de 1500 moléculas de CA asociadas en pentámeros y hexámeros según revelan estudios por ME<sup>37</sup> (Figura 8). Estudios recientes realizados con CA de VIF indican que esta proteína puede polimerizar *in vitro* formando una seudocápside en condiciones estrictas de concentración proteica, fuerza iónica y temperatura. Los análisis por ME han revelado que CA de VIF polimeriza *in vitro* formando estructuras esféricas. Datos que derivan del análisis por dispersión de luz (*Light scattering*) de dichas partículas indican que el diámetro aproximado que adoptan las mismas es de 32 nm. La cápside de VIF, a diferencia de la de VLB, se ensambla en condiciones de alta concentración de sales monovalentes. El comportamiento de ensamblaje de ambas cápsides parece ser similar, siendo posible tratarlas indistintamente, sin grandes variantes en la manipulación experimental<sup>38</sup>.



**Figura 8.** ME de la cápside de VIH (A) y de VIF (B).

## **Propuesta de trabajo y objetivos**

En el presente trabajo se trabajó en la puesta a punto de una técnica de *screening* para identificar moléculas bioactivas en la polimerización de la proteína CA de retrovirus con gran importancia en Salud. Además, se propuso identificar motivos estructurales con dicha actividad biológica. También se puso a punto la purificación de la CA de VIF para obtener cantidades suficientes para los ensayos de polimerización. La técnica de *screening* permitiría la identificación de moléculas con potencial interacción en el proceso de ensamblaje de las partículas virales de forma rápida, económica y sencilla. Esta interacción puede llevar a la interrupción de la infección y la consecuente eliminación del virus, convirtiendo a estas moléculas en potenciales antivirales. Con las moléculas identificadas se inicia un proceso de diseño bioguiado de moléculas bioactivas para la potenciación de la actividad biológica y el inicio del camino de desarrollo a un fármaco antiviral.

### ***Objetivo general***

Puesta a punto de un ensayo rápido y sencillo para la identificación de moléculas inhibidoras de polimerización de CA.

### ***Objetivos específicos:***

- 1- Puesta a punto de la obtención de proteína de CA de VIF en escala gramo.
  - A) Transformación de las bacterias con plásmido de CA de VIF.
  - B) Crecimiento de las bacterias e inducción de la expresión.
  - C) Lisis y purificación de la proteína de CA de VIF.
- 2- Puesta a punto del ensayo de polimerización de CA, mediante una técnica sencilla y económica que pueda ser utilizada en ensayos de cribado masivo (*Screening*).
  - A) A partir de la CA de VLB pura realizar los estudios de polimerización en presencia de DMSO.
  - B) Minimizar la cantidad de proteína en los ensayos de polimerización.
- 3- Búsqueda de motivos estructurales con actividad inhibitoria de la polimerización de CA utilizando la técnica desarrollada en el objetivo 1.



## **Materiales y métodos**

### ***Transformación de bacterias competentes con el plásmido que contiene la CA de VIF.***

Se transformaron bacterias *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS (cepa para expresión) y DH5 $\alpha$  (cepa para clonado) agregando 5  $\mu$ L de plásmido pRSET-p24 a 50  $\mu$ L de una suspensión de las bacterias quimiocompetentes y se incubaron en hielo por 20 minutos. Luego se incubaron por 90 segundos a 42°C y nuevamente en hielo por 2 minutos. Pasado este tiempo, se agregaron 300  $\mu$ L de medio LB y se incubaron por 50 minutos a 37°C con agitación a 200 r.p.m. Finalmente, se plaquearon 50  $\mu$ L de bacterias transformadas en placa de LB/agar/ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. El plásmido fue amablemente cedido por el Dr. Christophe Guillon, del Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université Lyon I, Lyon, Francia. Dicho plásmido codifica para la CA de VIF con una secuencia de 6 histidinas en el extremo N-terminal para su posterior purificación. La transformación fue confirmada por la presencia de colonias bacterianas capaces de crecer en presencia de ampicilina. Finalmente, se seleccionaron bacterias transformadas de una colonia aislada y se cultivaron a 37°C en medio de cultivo Terrific Broth (TB) con el agregado de ampicilina 25  $\mu$ g/mL y cloranfenicol 50  $\mu$ g/mL con el fin de generar crioinóculos para ser utilizados para el posterior crecimiento y expresión<sup>36</sup>.

***Expresión y purificación de la CA de VIF.*** Para esta etapa, se siguió el protocolo descrito en Guillon *et al*, 2013, con algunas modificaciones<sup>38</sup>. Brevemente, se crecieron las bacterias transformadas en TB hasta una densidad óptica a 600nm (OD<sub>600nm</sub>) de 0.3-0.4 unidades de absorbancia, y se indujo la expresión de CA mediante el agregado de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosida (IPTG) a una concentración final de 4 mM. Luego de 20 h de inducción a 25 °C, las células fueron centrifugadas durante 20 min a 8000 rpm. Los sedimentos celulares fueron pesados y luego almacenados a -80 °C hasta la purificación de CA<sup>36</sup>. El pellet de bacterias (15.7 g obtenidos a partir de 2 L de un cultivo líquido) se resuspendió y lisó en buffer LEW (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl), 5 mM imidazol, pH 8, con lisozima a una concentración final de 1 mg/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mg/mL y ADNasa I a una concentración final de 2 U/ml, seguido de 1 hora de incubación en hielo con agitación. La suspensión obtenida se lisó por sonicación (Omni Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer) en hielo durante 3 ciclos de 3 minutos. Las bacterias lisadas fueron clarificadas por

centrifugación a 16000 x g por 30 minutos y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . El sobrenadante obtenido se cargó en una columna HisTrap<sup>TM</sup> HP, 1 mL, empaquetada con una resina de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa. La fracción no unida a la columna (FNU) fue cargada nuevamente en la misma. A continuación se conectó la columna al sistema de purificación de proteínas ÄKTA<sup>TM</sup>, se realizó un lavado con 10 volúmenes de buffer LEW con 30 mM imidazol, y finalmente la CA de VIF fue eluida en un gradiente de imidazol en buffer LEW. La concentración aparente de la proteína recombinante fue determinada a partir de los datos de absorbancia a 280 nm, por la Ley de Beer, utilizando el  $\epsilon$  teórico (calculado con el programa online expasy)<sup>39</sup>, obtenido a partir de la secuencia aminoacídica de CA de VIF extraída de la base de datos libre Uniprot<sup>40</sup>. La identidad y la pureza de CA de VIF se evaluaron usando un estándar por análisis por SDS-PAGE. La proteína fue dializada contra 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.4) y concentrada usando un dispositivo de ultrafiltración Corning Spin-X Concentrator 20 mL (10 kDa MWCO, Sartorius).

***Polimerización in vitro de la proteína recombinante CA de VIF.*** La mezcla de reacción de polimerización de CA de VIF se realizó en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  en placas de 96 pocillos y la concentración final de la proteína fue de 5.0 mg/mL, 10 mg/mL y 15 mg/mL en Buffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 1 M, pH 7.4. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm cada 30 segundos, en un lector de placas Varioskan<sup>TM</sup> Flash Multimode Reader (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) a 37 °C, durante 30 minutos.

***Polimerización in vitro de la proteína recombinante CA de VLB.*** La proteína CA de VLB pura fue gentilmente cedida por el Dr. Otto Pritsch y purificada por Federico Carrión, de la Unidad de Biofísica de Proteínas, del Instituto Pasteur de Montevideo. La mezcla de reacción de polimerización de CA de VLB se realizó en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  en placas de 96 pocillos, la concentración final de la proteína fue de 5.0 mg/mL (178  $\mu\text{M}$ ) en Buffer HEPES 20 mM, NaCl 50 mM, H<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub> 300 mM pH 7.4, DMSO 0.5% (70  $\mu\text{M}$ ) (concentración máxima estricta). Se midió la absorbancia a una longitud

de onda de 340 nm cada dos minutos en un equipo Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific™) a 38°C, por un tiempo total de 80 minutos.

***Selección de los compuestos a ensayar.*** De una quimioteca de más de 1000 compuestos diferentes se seleccionaron los compuestos para utilizar en los ensayos de inhibición del ensamblaje. La quimioteca fue gentilmente cedida por el Grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica. En primera instancia se fijaron arbitrariamente tres criterios de selección: 1) similitud estructural con los inhibidores de la polimerización de CA de VIH reportados, 2) abundancia y simplicidad en la síntesis, y por último, 3) elección al azar. Para el primer criterio se utilizó el software gestor de librerías de compuestos (Quimiotecas) ChemBioFinder Ultra 2.0.

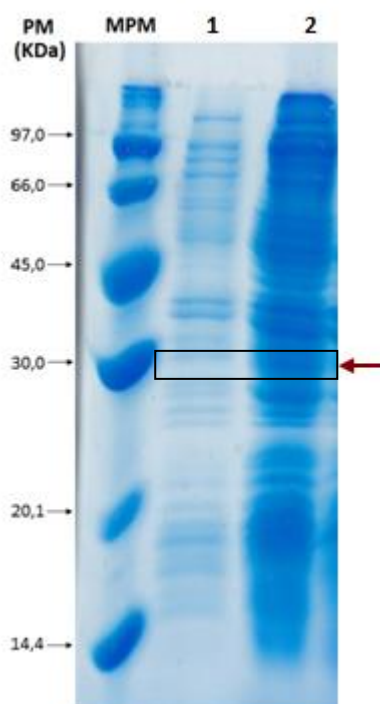
***Preparación de las muestras para los ensayos de inhibición.*** Los compuestos se disolvieron en DMSO en una concentración aproximada de 15 mM (stock). Partiendo de la solución stock se realizaron diluciones seriadas variando gradualmente la proporción de DMSO/H<sub>2</sub>O para minimizar la precipitación de los compuestos.

***Ensayos de inhibición de la polimerización de CA de VLB.*** Se utilizó glucosa a una concentración de 30 μM como control negativo, para evaluar el efecto de una molécula orgánica cualquiera (no fármaco) en la reacción de polimerización. La reacción de polimerización se realizó en un volumen final de 50 μL en placas de 96 pocillos, la concentración final de la proteína fue de 5.0 mg/mL (178 μM) en Buffer HEPES 20 mM/ NaCl 50 mM/ H<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub> 300 mM pH 7.4, DMSO 0.5%. La concentración inicial de incubación de los compuestos fue de 30 μM. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm cada dos minutos, en un equipo Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific™), a 38°C, por un tiempo total de 80 minutos. La reacción de polimerización se inició con la incorporación de la proteína, el tiempo total de incubación compuesto-proteína fue de 80 min.

## Resultados y discusión

**Transformación de bacterias competentes con el plásmido que codifica para la CA de VIF.** Se logró obtener cultivos bacterianos de *E. coli* BL21(DE3)pLysS que crecían en un medio en presencia de Ampicilina y Cloranfenicol, confirmando la presencia del plásmido que contiene la secuencia que codifica para CA de VIF. El plásmido utilizado fue secuenciado previamente por el Dr. Guillon.

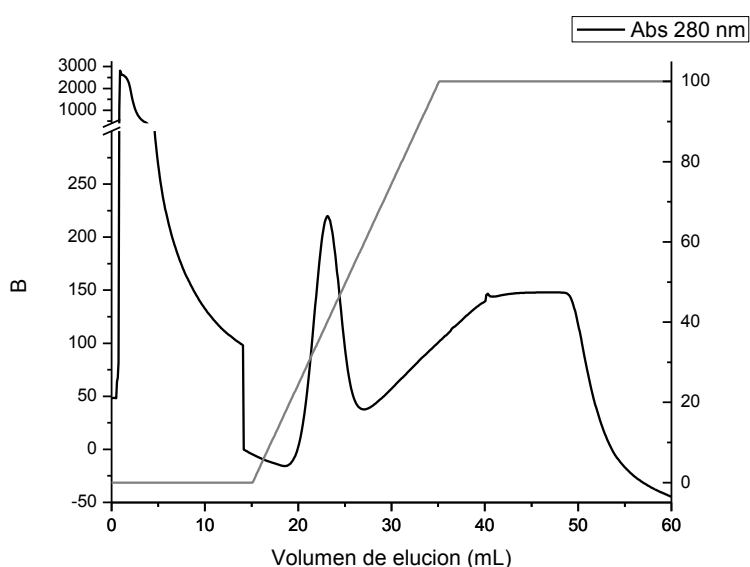
**Expresión y purificación de CA de VIF.** La CA se expresó luego de 20 horas de inducción en presencia de IPTG a una concentración final de 4 mM como se observa en la figura 9. La intensidad de la banda de CA en la fracción luego de la inducción se muestra muy tenue indicando una baja expresión de la proteína. También se observa la ausencia de la misma en el carril contiguo correspondiente a la fracción del cultivo previa a la inducción (carril 1). La correcta verificación de la presencia de CA se puede seguir con un anticuerpo anti-cola de histidina mediante western blot.



**Figura 9.** Análisis por SDS-PAGE (12%) de la expresión de CA VIF recombinante. MPM: marcador de peso molecular; 1) lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS p24 VIF<sup>+</sup> sin inducir; 2) lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS p24 VIF<sup>+</sup> luego de 20 h de inducción. La

flecha roja indica la banda correspondiente a la proteína recombinante de peso molecular aparente de 28 kDa.

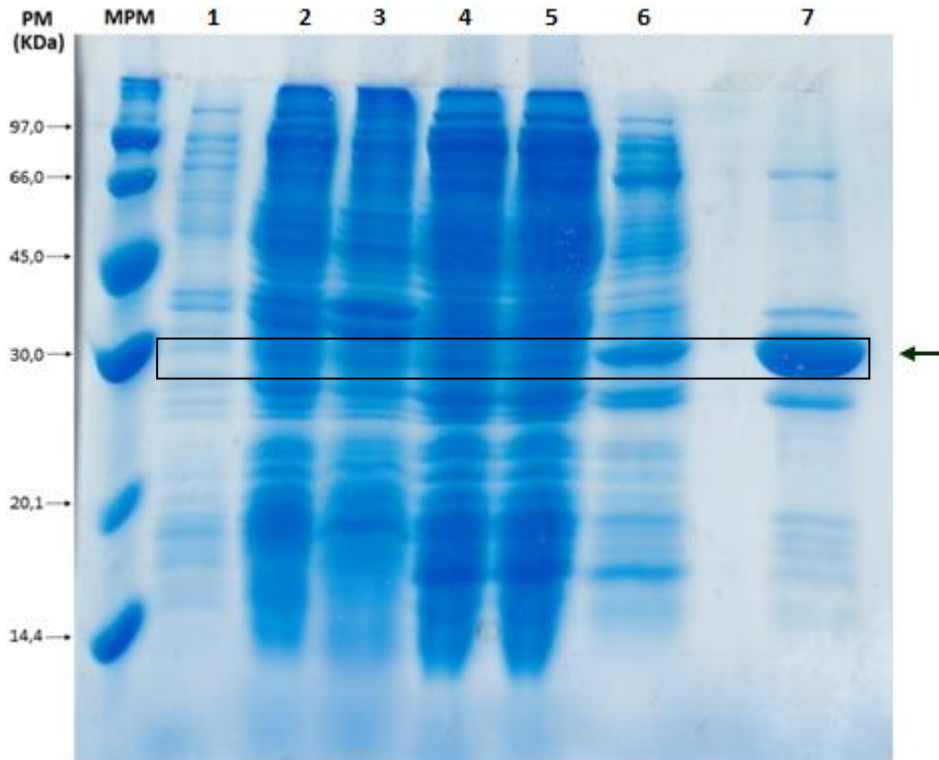
Se trabajó en la puesta a punto de la purificación de CA de VIF mediante el uso de columnas de IMAC, obteniéndose el mejor resultado al acoplarla a un equipo de cromatografía FPLC. La CA de VIF recombinante se eluyó mediante un gradiente continuo de imidazol, obteniéndose un pico entre 145 y 312 mM imidazol (18 a 28 mL), como se observa en la Figura 10.



**Figura 10.** Cromatograma de elución de la CA de VIF. Pico de CA entre los 18 y los 28 mL.

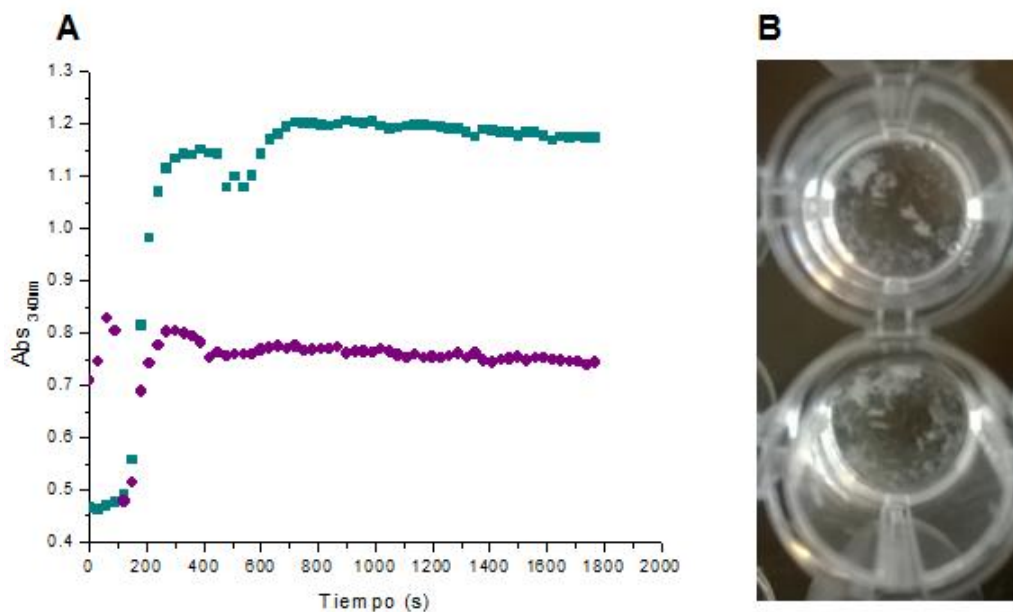
Todas las fracciones recolectadas en los procesos de expresión y purificación de CA fueron analizadas mediante SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 11, la banda correspondiente a CA de VIF se muestra muy tenue en las diversas fracciones correspondientes a los pasos iniciales de expresión y purificación (carriles 2-6). El carril 8 corresponde a una muestra del pico del cromatograma de la Figura 10, en el cual se observa la presencia de una banda mayoritaria de peso molecular aparente de 28 kDa, así como algunos contaminantes, indicando que la purificación no resultó del todo exitosa, pudiendo deberse a una baja expresión de la proteína, como se discutió en la Figura 9, o por precipitación de la proteína en el proceso. La resina reportada en

trabajos previos demostró mejores resultados. La CA se obtiene con una pureza menor al 80% y con un rendimiento menor que el reportado por Guillon *et al*, 2013.<sup>38</sup> Se obtuvieron a partir de 15.7 g de pellet 5,4 mg de CA con una pureza del 80%.

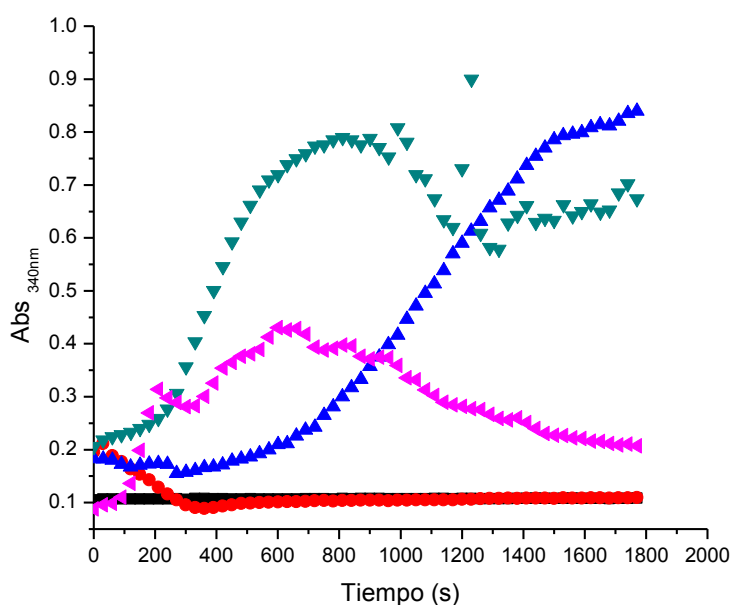


**Figura 11.** Análisis por SDS-PAGE (poliacrilamida 12%) de la expresión y purificación de CA VIF recombinante. MPM: marcador de peso molecular; 1: lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS p24 VIF<sup>+</sup> sin inducir; 2: lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS p24 VIF<sup>+</sup> luego de 20 horas de inducción con IPTG; 3: fracción insoluble luego de la lisis por sonicado y centrifugación; 4: fracción soluble de lisado bacteriano; 5: fracción no unida a la columna de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa; 6: fracción de lavado con buffer LEW con imidazol 30 mM; 7: fracción de elución de CA de VIF. Se indica con una flecha la banda correspondiente a la proteína recombinante.

**Ensayo de polimerización de la CA de VIF.** Como se observa en la Figura 12, CA de VIF recombinante posee la capacidad de polimerizar *in vitro* en las condiciones ensayadas. Con el total de la proteína obtenida se planificaron 6 experimentos por duplicado, ensayándose 4 condiciones diferentes de proteína y una condición sin el agregado de sal monovalente a altas concentraciones. La polimerización comenzó muy rápidamente antes de terminar el agregado de la proteína de los restantes pocillos. Incluso polimerizó en ausencia de las sales monovalentes a altas concentraciones, más lentamente, dando una curva más homogénea (Figura 13, trazo azul). Se observa que a concentraciones mayores o iguales a 10 mg/mL la reacción es muy rápida y brusca, provocando la saturación del lector y una curva heterogénea. Confirmamos que en esos pocillos ocurrió la polimerización visualmente, como se muestra en la foto (Figura 12). La polimerización no se ve afectada por la presencia de impurezas de otras proteínas, ya que la polimerización se dio de igual manera que en las condiciones reportadas por Guillon *et al*, 2013.<sup>38</sup>



**Figura 12.** A) Polimerización *in vitro* de la CA de VIF a una concentración final aparente de (■) 10 mg/mL y (◆) 15 mg/mL, ambos en presencia de NaCl 1M. B) Fotografía de la placa donde se muestra la polimerización a simple vista.



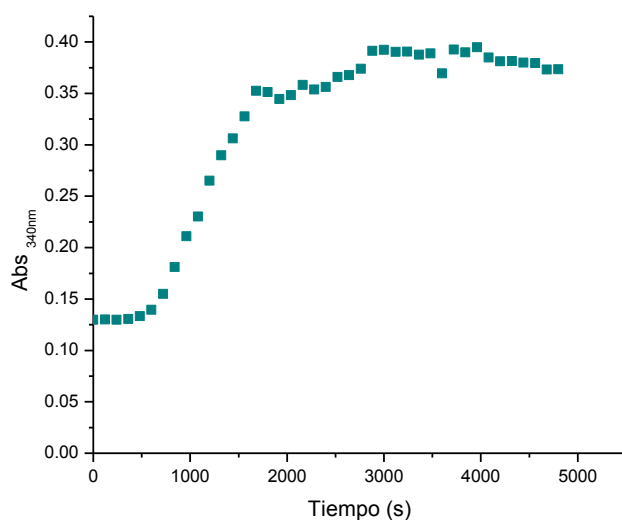
**Figura 13.** Polimerización *in vitro* de CA de VIF. (■) Condición control en ausencia de CA de VIF, NaCl 1 M, (●) condición control CA de VIF 5 mg/mL en ausencia de NaCl, (▲) condición control de CA de VIF 10 mg/mL en ausencia de NaCl, (▼) CA VIF 5 mg/mL, NaCl 1M, (◆) CA VIF 10 mg/mL, NaCl 1M.

***Puesta a punto del ensayo de polimerización de la CA de VLB. Ajuste de la concentración de DMSO.*** El primer punto para ajustar en el protocolo de polimerización de p24 de VLB fue la concentración de DMSO. El DMSO es el disolvente por excelencia utilizado en ensayos biológicos que utilizan moléculas orgánicas insolubles en agua. Este es capaz de disolver una amplia gama de compuestos. Incluso se debió ajustar el procedimiento de disolución para lograr la minimización de la precipitación de las moléculas a 30  $\mu$ M en el porcentaje de DMSO deseado, una concentración arbitraria fijada para obtener resultados biológicos de inhibición leves, moderados y altos.<sup>41</sup> Esta concentración brinda un equilibrio entre una máxima concentración de ensayo con mínima precipitación. Es de gran importancia el estado de agregación del compuesto al momento del ensayo de polimerización, ya que una molécula precipitada (es decir en estado sólido) puede dar tanto falsos positivos como falsos negativos; falsos positivos por estimular la precipitación de la proteína por agregación inespecífica, y falsos negativos por tener una dosis baja en solución de la molécula en el ensayo (menor



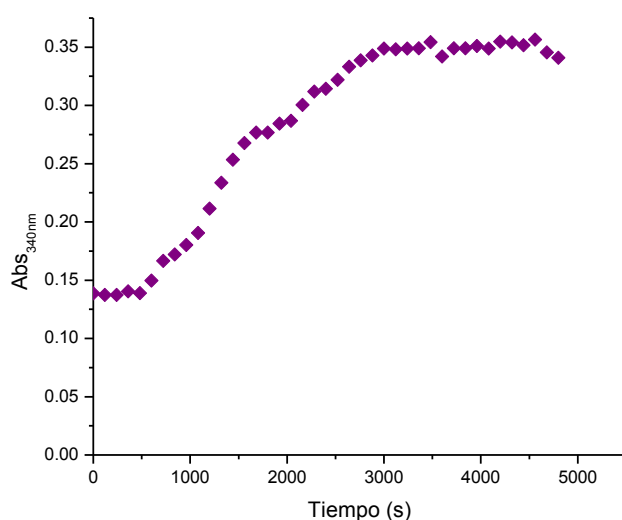
número de moles disponibles para interactuar con la proteína y lograr una inhibición). Para minimizar la precipitación de los compuestos se bajó gradualmente el % v/v de DMSO hasta el porcentaje deseado en el ensayo.

Se evaluaron las concentraciones de DMSO a partir de 10%, un máximo aceptado para otras proteínas y enzimas en ensayos de inhibición. Se ensayó al 10, 5, 1 y 0.5%. Todas las concentraciones mayores a 0.5% inhibieron la polimerización al 100%. La concentración de DMSO resultó ser crítica para la correcta solubilidad de los compuestos, aunque la polimerización fue muy sensible a este solvente. La concentración mínima aceptable, aunque muy baja para evitar la precipitación, fue la de 0,5% (Figura 14).



**Figura 14.** Condiciones óptimas del polimerización *in vitro* de CA de VLB. En este ensayo se utilizó una concentración de CA de VLB de 5 mg/mL en DMSO 0.5% (■).

Control negativo. Se evaluó, por otro lado, el efecto de la presencia de glucosa en el medio de reacción (Figura 15). Una concentración de 30  $\mu\text{M}$  de glucosa parece no afectar significativamente la polimerización de CA de VLB. Mediante el uso de dicha molécula se pretende simular la presencia de una molécula cualquiera (de tipo orgánica) que no tiene características de fármaco, como ser otras moléculas endógenas. Dicha prueba se realizó como control de la robustez de la polimerización, para mostrar que cualquier molécula no afecta el ensamblaje, apoyando así los resultados obtenidos posteriormente en el ensayo biológico.

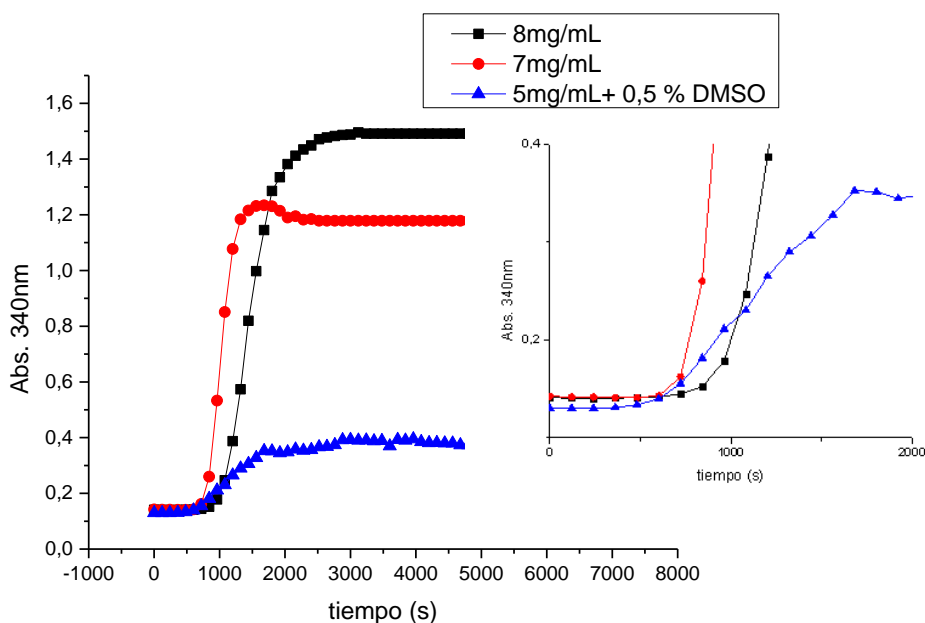


**Figura 15.** Efecto de la presencia de glucosa en la polimerización de CA de VLB. En este ensayo se utilizó una concentración de CA de 5 mg/mL, y glucosa 30  $\mu\text{M}$  en Buffer HEPES 20 mM, NaCl 50 mM,  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  300 mM pH 7.4 (◆).

Minimización de la cantidad de proteína a utilizar. Una desventaja de los ensayos de polimerización *in vitro* de la CA es la gran cantidad de proteína que se necesita para que la reacción ocurra. Para minimizar la concentración necesaria en las condiciones del ensayo de *screening*, se cambiaron dos variables: el volumen final de reacción, que depende de la placa a utilizar en el lector de placas, pudiéndose utilizar entre 50 y 400  $\mu\text{L}$  en las placas de 96 pocillos. La limitante es en este caso el instrumental para el

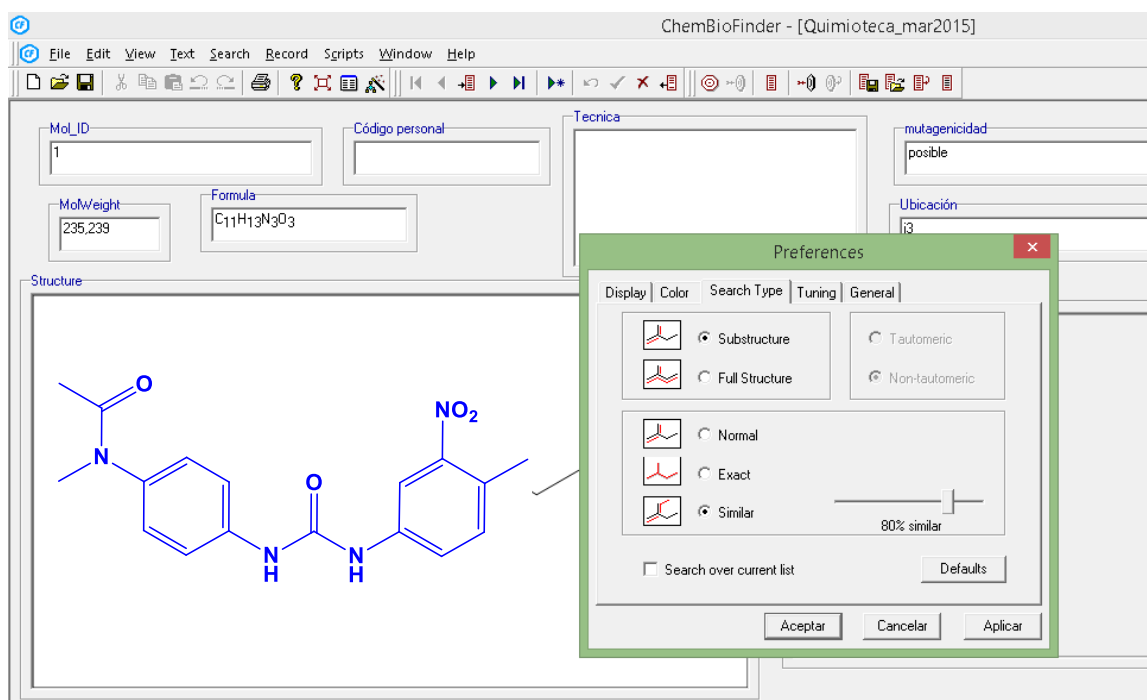
pipeteo de los compuestos. Se decidió entonces trabajar con un volumen de 50  $\mu\text{L}$  en placas de 96 pocillos, minimizando 4 veces la cantidad de proteína a utilizar en relación al uso estándar de las placas en ensayos estándar de ELISA. Se evaluaron además concentraciones sucesivas de proteína disminuyendo de a 1 mg/mL (Figura 16). Se observa una señal clara de polimerización para concentraciones entre 8 y 4 mg/mL. La variación más importante no fue en el tiempo de inicio de la polimerización sino en el máximo de absorbancia alcanzado, que disminuyó con la concentración de proteína. Además, para las concentraciones de 5 a 3 mg/mL se ensayó la polimerización duplicando la concentración de los iones divalentes en relación a la reportada (300mM  $\text{PO}_4^{2-}$ ). Esto afectó solamente el tiempo de inicio de la polimerización y las pendientes de la velocidad inicial, que nuevamente fueron óptimos para la concentración de 4 mg/mL, dando una buena señal de absorbancia cercana a 0.5 OD en tiempos razonables de incubación (40 min).

El tiempo de incubación trató de moderarse entre 60 y 120 minutos, tiempo razonablemente corto para ensayar cientos de moléculas por ensayo y lo suficientemente largo para asegurar una interacción y/o reacción de las moléculas con la proteína y su consecuente efecto en la polimerización. Si bien los tiempos y la absorbancia eran óptimos para la concentración de proteína de 4 mg/mL, esto cambió cuando se incorporó el DMSO necesario para el ensayo (0,5%), debiendo utilizar entonces la proteína a una concentración de 5 mg/mL, que permitía mantener los parámetros de polimerización en presencia del DMSO. En la Figura 16 se puede ver también que las velocidades iniciales de polimerización ( $V_i$ ) cambian cuando se incorpora DMSO a la reacción. La velocidad inicial de polimerización para 8 mg/mL de proteína (sin DMSO) es de 0.86 mOD/s, mientras que a 5 mg/mL de proteína (0.5% DMSO) es de 0.13 mOD/s, 7 veces más lenta, aunque en el mismo orden.



**Figura 16.** Efecto de la concentración de proteína en la polimerización de CA. **Inset:** ajuste de los ejes para mostrar mejor la forma sigmoidea de la condición con DMSO.

Elección de los compuestos a ensayar. No existe evidencia hasta el momento de ningún inhibidor de la CA de VLB ni de VIF. Si bien se mostraron en la introducción algunas moléculas, estas no se ensayaron con las proteínas *in vitro* y no se tienen datos de inhibición al respecto. Por otra parte, dichas moléculas son muy complejas estructuralmente, escapando del interés de este trabajo de encontrar moléculas menos complejas. Sin embargo, para VIH sí existe una extensa bibliografía de inhibidores, por lo que se utilizaron algunas de estas moléculas para la búsqueda de compuestos similares en la quimioteca. Se muestra en la Figura 17, a modo de ejemplo, la elección de una molécula de la quimioteca siguiendo el criterio de similitud estructural, utilizando el programa ChemOffice.

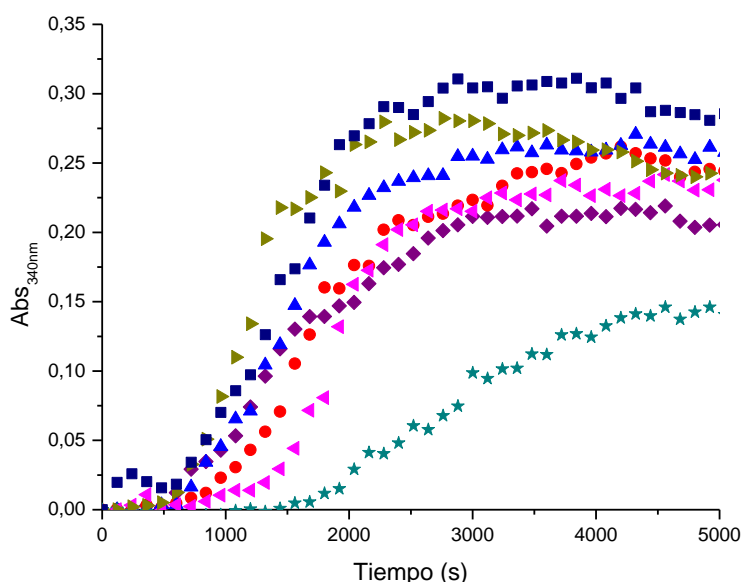


**Figura 17.** Se muestra el input para la búsqueda de similares en la quimioteca. Fijando un 90% de similitud estructural con el compuesto mostrado, inhibidor de la polimerización de CA de VIH (Figura 3), se encontraron 25 similares de un total de 1218 compuestos.

**Ensayo de inhibición con compuestos de la quimioteca.** Una vez optimizado el ensayo de polimerización en condiciones de *screening* y seleccionadas las moléculas de la quimioteca a ensayar, se procedió al ensayo de inhibición. Luego de disolver los compuestos y corroborar su estado de agregación, se incubaron con la proteína y se comenzó a registrar inmediatamente las medidas. Se realizaron 3 experimentos independientes con los compuestos elegidos al azar del grupo previamente seleccionado, esto último para minimizar el efecto de los condicionamientos y errores de manipulación (aumentando la diversidad y el número de posibilidades).

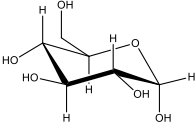
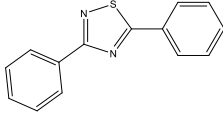
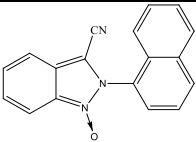
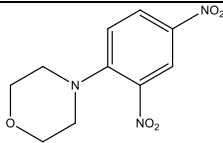
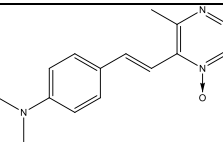
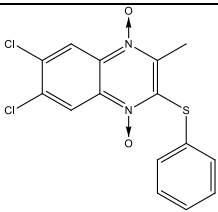
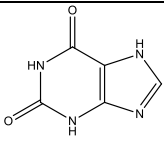
**Primer experimento con compuestos (Grupo 1):** Seis moléculas de las preseleccionadas de la quimioteca fueron seleccionadas al azar. El compuesto ID\_244 fue el único que no precipitó en las condiciones del ensayo. Los resultados obtenidos para el Grupo 1 muestran que el compuesto ID\_244 es el que más afecta la polimerización de CA de VLB a 30  $\mu$ M (Figura 18). El resto de los compuestos se pueden considerar sin efecto a

esa concentración ya que la glucosa marca el efecto aleatorio de una molécula cualquiera y está por debajo del resto de los compuestos. El compuesto ID\_244 afecta en aproximadamente un 60% la reacción de polimerización. La Vi del control negativo es de 0.1 mOD/s y en presencia del compuesto es de 0.06 mOD/s. Se debe destacar también que se utilizó una concentración de CA seis veces en exceso con respecto a la concentración de compuesto. En general, en ensayos de inhibición enzimática, es necesario poner un exceso de compuesto para tener un efecto de inhibición como el observado<sup>42</sup>. Es decir que el compuesto ID\_244 no interacciona mol a mol para inhibir la polimerización, indicando un efecto en otras estructuras de tamaño mayor en el proceso de polimerización.



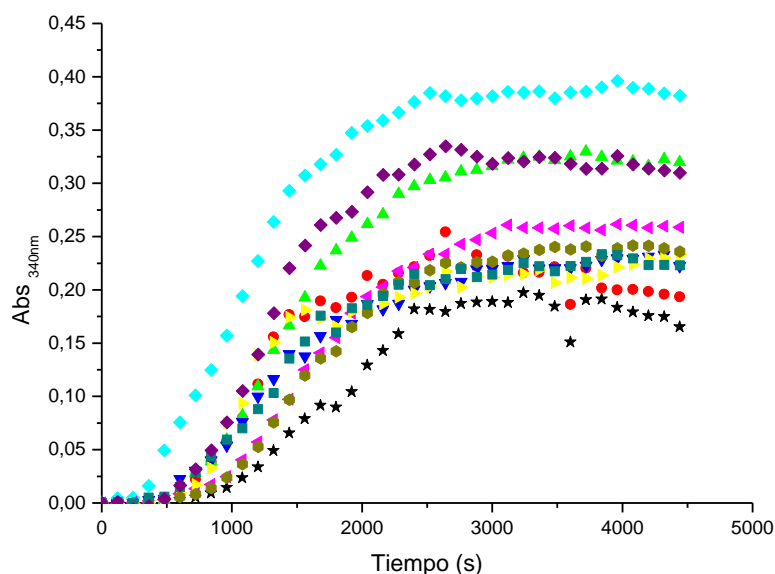
**Figura 18.** Estudio de la polimerización *in vitro* de CA de VLB. Se utilizó la CA de VLB en una concentración final de 5 mg/mL en presencia de (◆) glucosa 30  $\mu$ M, (●) compuesto ID\_188 30  $\mu$ M, (▲) compuesto ID\_203 30  $\mu$ M, (★) compuesto ID\_244 30  $\mu$ M, (◀) compuesto ID\_641 30  $\mu$ M, (▶) compuesto ID\_656 30  $\mu$ M, y (■) compuesto ID\_771 30  $\mu$ M.

**Tabla 3.** Algunos parámetros utilizados para evaluar la actividad biológica de los compuestos del Grupo 1 en la reacción de polimerización de CA de VLB.

Identificación	Estructura	Vi (mOD/s)*	OD max
Blanco		0.13	0.5
Glucosa		0.10	0.2
ID_188		0.10	0.3
ID_203		0.12	0.3
ID_244		0.06	0.1
ID_641		0.11	0.2
ID_656		0.16	0.3
ID_771		0.14	0.3

\*Vi (velocidad inicial de polimerización) Calculado por la pendiente de los tiempos iniciales después de iniciada la reacción, que muestran linealidad con un  $R^2$  mayor a 0.99

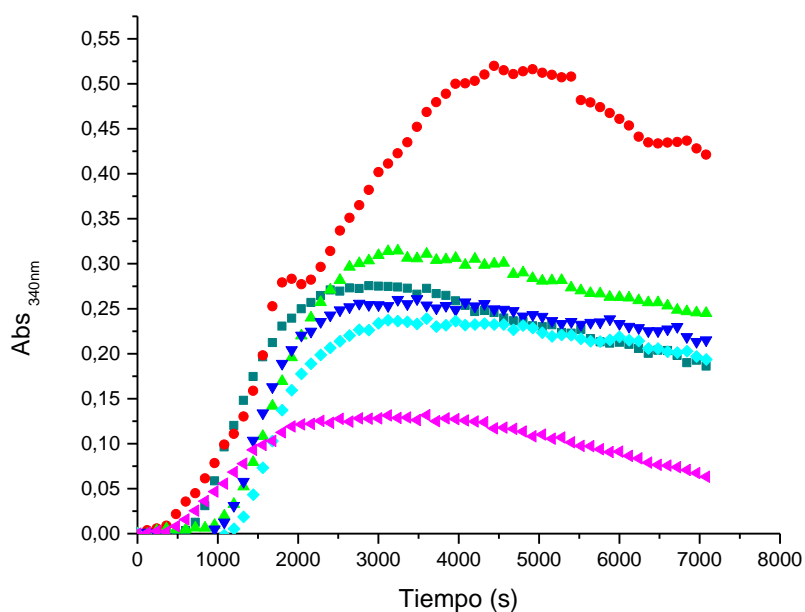
Segundo experimento con compuestos (Grupo 2): Para este ensayo se seleccionaron ocho moléculas, las cuales comparten similitudes estructurales con el compuesto ID\_244, debido a que el mismo puede mantenerse en solución incluso a muy bajas concentraciones de DMSO. Aparentemente ningún compuesto de este grupo interfiere en la polimerización de CA. Por su parte, el compuesto ID\_365 estimula la polimerización, lo que puede llegar a ser un resultado interesante si este compuesto estabiliza la pseudocápside viral impidiendo de esta forma el ciclo normal del virus. La  $V_i$  del compuesto fue de 0.22 mOD/s, es decir el doble de la obtenida bajo las condiciones control. Para este grupo se esperaban más resultados de actividad debido a que estos compuestos compartían similitudes mayores al 90% con el compuesto identificado en el Grupo 1.



**Figura 19.** Estudio de polimerización *in vitro* de CA de VLB. Se utilizó una concentración proteica de 5 mg/mL en presencia de (■) DMSO 0.5%, (◆) glucosa 30 µM, (★) compuesto ID\_130 65 µM, (●) compuesto ID\_243 30 µM, (▲) compuesto ID\_245 30 µM, (▼) compuesto ID\_248 30 µM, (◆) compuesto ID\_365 30 µM, (◆) compuesto ID\_459 30 µM, (▲) compuesto ID\_609 30 µM, y (▲) compuesto ID\_701 30 µM.



Tercer experimento con compuestos (Grupo 3): Fueron seleccionadas al azar para éstos ensayos cinco moléculas de la quimioteca. Como se observa en la Figura 20, el compuesto ID\_681 parece afectar levemente la polimerización de CA de VLB, dando una  $V_i$  de 0.09 mOD/s pero una importante disminución de la absorbancia con un máximo de 0.13. El efecto podría estar ocurriendo después del inicio de la reacción afectando la incorporación de nuevas moléculas de CA al polímero. Por otra parte el compuesto ID\_111 parece inducir notoriamente un efecto sobre la polimerización de CA de VLB. En este caso el ensamblaje se estimula por la presencia de la molécula, observándose mayoritariamente el efecto en la absorbancia máxima, que aumenta hasta 0.55, mientras la  $V_i$  se ve levemente afectada (0.15 mOD/s). Nuevamente, esto último representa un resultado interesante a la hora de emplear compuestos que afecten las estructuras virales, dado que la estabilización de la cápside viral impidiendo su desensamblaje podría bloquear la etapa de ingreso del genoma viral a la célula.



**Figura 20.** Estudio de la polimerización *in vitro* de CA de VLB. Se utilizó una concentración proteica de 5 mg/mL en presencia de DMSO 0.5% (■), compuesto ID\_111 30 µM (●), compuesto ID\_207 30 µM (▲), compuesto ID\_353 30 µM (▼), compuesto ID\_598 30 µM (◆), compuesto ID\_681 30 µM (◆).

## Conclusiones y perspectivas

Se logró implementar la purificación de la CA de VIF en el laboratorio. Además, se ensayó la reacción de polimerización de la CA obtenida con un nuevo protocolo utilizando lector de placas múltiple, permitiendo optimizar su estudio en ensayos de *screening*, minimizando el tiempo y cantidad de proteína a utilizar.

Se optimizó un ensayo de screening para cientos de compuestos con la CA de VLB. Se minimizaron las cantidades de proteína a utilizar y se fijaron las condiciones necesarias para diferenciar moléculas con actividad biológica en el proceso de polimerización de la CA de VLB. Se ensayaron unas 20 moléculas en el ensayo optimizado, de las cuales se identificaron 4 moléculas interesantes que pueden servir para el inicio de un proceso de diseño bioguiado de nuevas moléculas con actividad potenciada.

En el futuro, se plantea hacer estudios computacionales con la estructura cristalográfica de CA y los miles de compuestos de la quimioteca, para ensayarlos luego en la reacción de polimerización puesta a punto en este trabajo, así como realizar los mismos estudios para VIF. Estos resultados, sumados a los encontrados durante el desarrollo de esta tesina, permitirán iniciar y acompañarán el proceso de diseño bioguiado con las estructuras identificadas con potencial actividad en el proceso de polimerización de CA.

## Bibliografia

- 
- 1 [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2013\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf)
- 2 Kettmann R, Portetelle D, Mammerickx M, Cleuter Y, Dekegel D, Galoux M, Ghysdael J, Burny A, Chantrenne H, Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1976**, 73, 1014–1018.
- 3 Burny A, Cleuter Y, Kettman R, Mammerickx M, Marbaix G, Portelle D, Vanden Broeke A, Willems L, Thomas R Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet Microbiol*, **1998**, 17, 197–218.
- 4 Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerick M, Willens L, Portetelle D Bovine leukaemia virus. In: Levy JA (ed) *The retroviridae*. Plenum Press, New York, **1994**, 39–81.
- 5 Llamas L, Goyache J, Domenech A, Arjona A, Suarez G, Gomez- Lucia E. Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. *J Clin Virol*, **2001**, 22, 31–39.
- 6 Chi J, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum. *Prev Vet Med*. **2002**, 30, 137-53.
- 7 Frie M. C., Coussens P.M. Veterinary Immunology and Immunopathology Bovine leukemia virus : A major silent threat to proper immune responses in cattle, **2015**, *163*, 103–114.
- 8 Meas S, Usui T, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, 060-0818, Sapporo, Japan. *Veterinary Microbiology*. **2002**, *84*, 275-282
- 9 Moratorio G., Obal G., Dubra A., Cristina J., Pritsch, O. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes, **2010**, *155*, 481–489.
- 10 Bendinelli M, Pistello M, Lombardi S, Poli A, Garzelli C, Matteucci D, Ceccherini-Nelli L, Malvaldi G, Tozzini F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin Microbiol Rev*. **1995**, *1*, 87-112.
- 11 Ravi M, Wobeser G, Taylor S, Jackson M. Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus article - a comment. *Can Vet J*. **2011**, *11*, 1161
- 12 Mohammadi, H., & Bienzle, D. Pharmacological inhibition of feline immunodeficiency virus (FIV). *Viruses*, **2012**, *4*, 708–24.
- 13 Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, De Brogniez A, Sánchez-Alcaraz M.T, Boxus M, Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L, Willems L. Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV. *Viruses* **2011**, *3*, 1210-1248.
- 14 Bretscher M. T., Althaus C. L., Müller V., Bonhoeffer S. Recombination in HIV and the evolution of drug resistance: For better or for worse? *BioEssays*, **2004**, *26*, 180–188.
- 15 Rogo T., DeLong K., Chan P., Kantor R. Antiretroviral Treatment Failure, Drug resistance and Subtype Diversity in the only Pediatric HIV Clinic in Rhode Island. *Clin Infect Dis*, **2015**, 1–10.
- 16 Jensen WA, Wicks-Beard BJ, Cockerell GL. Inhibition of protein kinase C results in decreased expression of bovine leukemia virus. *J Virol*. **1992**, *66*, 4427-33.
- 17 Willems L, Gatot JS, Mammerickx M, Portetelle D, Burny A, Kerkhofs P, Kettmann R. 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*. **1995**, *69*, 4137-4141.
- 18 Willems L, Gegonne A, Chen G, Burny A, Kettmann R, Ghysdael J. The bovine leukemia virus p34 is a transactivator protein. *EMBO J*. **1987**, *6*, 3385–3389.
- 19 Bruck C, Rensonnet N, Portetelle D, Cleuter Y, Mammerickx M, Burny A, Mamoun R, Guillemain B, van der Maaten MJ, Ghysdael J. Biologically active epitopes of bovine leukemia

- 
- virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability. *Viol*, **1984**, *136*, 20-31.
- 20 Gildeen RV, Long CW, Hanson M, Toni R, Charman HP, Oroszlan S, Miller JM, Van der Maaten MJ. Characteristics of the major internal protein and RNA-dependent DNA polymerase of bovine leukaemia virus. *T J Gen Virol*, **1975**, *29*, 305-14.
- 21 Reimer K, Matthes E, Scholz D, Rosenthal HA. Effects of suramin, HPA-23 and 3'-azidothymidine triphosphate on the reverse transcriptase of bovine leukaemia virus. *Acta Virol*, **1989**, *33*, 43-9.
- 22 Sidwell R.W., Smee D.F. Bovineleukemiavirus inhibition *in vitro* by ribavirin. *Antiviral Res*, **1981**, *1*, 47-53.
- 23 Jensen W., Wicks-Beard B.J., Cockerell G.L. Inhibition of protein kinase C results in decreased expression of bovine leukemia virus. *J Virol*, **1992**, *66*, 4427-33.
- 24 Ferens W., Hovde C. J. Antiviral activity of shiga toxin 1: suppression of bovine leukemia virus-related spontaneous lymphocyte proliferation. *Infec Imm*, **2000**, *68*, 4462-9.
- 25 Domenech R, Neira JL. The HIV-1 capsid protein as a drug target: recent advances and future prospects. *Curr Protein Pept Sci*. **2013**, *8*, 658-668.
- 26 Shi J, Zhou J, Shah VB, Aiken C, Whitby K. Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization. *J Virol*. **2011**, *1*, 542-549.
- 27 Lemke C. T., Titolo S., von Schwedler U., Goudreau N., Mercier J.-F., Wardrop E., Mason S. W. Distinct effects of two HIV-1 capsid assembly inhibitor families that bind the same site within the N-terminal domain of the viral CA protein. *J Virol*, **2012**, *86*, 6643-6655.
- 28 Fader L.D., Bethell R., Bonneau P., Bös M., Bousquet Y., Cordingley M. G. Yoakim C. Discovery of a 1,5-dihydrobenzo[b][1,4]diazepine-2,4-dione series of inhibitors of HIV-1 capsid assembly. *Bioorg Med Chem Lett*, **2011**, *21*, 398-404.
- 29 Fader L.D., Landry S., Goulet S., Morin S., Kawai S.H., Bousquet Y., Simoneau B. Optimization of a 1,5-dihydrobenzo[b][1,4]diazepine-2,4-dione series of HIV capsid assembly inhibitors 2: structure-activity relationships (SAR) of the C3-phenyl moiety. *Bioorg Med Chem Lett*, **2013**, *23*, 3401-3405.
- 30 Tang C., Loeliger E., Kinde I., Kyere S., Mayo K., Barklis E., Summers M. F. Antiviral Inhibition of the HIV-1 Capsid Protein. *J Mol Bio*, **2003**, *327*, 1013-1020.
- 31 Tremblay M., Bonneau P., Bousquet Y., DeRoy P., Duan J., Duplessis M., Yoakim C. Inhibition of HIV-1 capsid assembly: optimization of the antiviral potency by site selective modifications at N1, C2 and C16 of a 5-(5-furan-2-yl-pyrazol-1-yl)-1H-benzimidazole scaffold. *Bioorg Med Chem Lett*, **2012**, *22*, 7512-7517.
- 32 Prevelige P. Small Molecule Inhibitors of HIV-1 Capsid Assembly, **2005**, US patent.
- 33 Curreli F., Zhang H., Zhang X., Pyatkin I., Victor Z., Altieri A., Debnath A. K. Virtual screening based identification of novel small-molecule inhibitors targeted to the HIV-1 capsid. *Bioorg Med Chem*, **2011**, *19*, 77-90.
- 34 Briggs J.G., Grünwald K., Glass B., Förster F., Kräusslich H.G., Fuller S.D. The mechanism of HIV-1 core assembly: Insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure*, **2006**, *14*, 15-20.
- 35 Obal G., Trajtenberg F., Carrion F., Tome L., Larrieux N., Zhang X., Buschiazzo, Conformational plasticity of a native retroviral capsid revealed by x-ray crystallography. *Science*, **2015**, (June), 1-22.
- 36 Obal, G. Estudios Biofísicos y Estructurales del Ensamblado de la Cápside del Virus de la Leucemia Bovina, Doctorado en Ciencias Biológicas (UDELAR-PEDECIBA), **2014**
- 37 Briggs JA, Wilk T, Welker R, Krausslich HG, Fuller SD. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J*. **2003**; *22*, 1707-1715.
- 38 Serrière, J., Fenel, D., Schoehn, G., Gouet, P., & Guillon, C. Biophysical characterization of the feline immunodeficiency virus p24 capsid protein conformation and *in vitro* capsid assembly. *PLoS One*, **2013**, *8*, e56424.
- 39 <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P16087@136-357@>

---

40 <http://www.uniprot.org/uniprot/P16087>

41 Alvarez G., Aguirre-López B., Varela J., Cabrera M., Merlino A., López G.V, Gómez-Puyou A. Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Eur J Med Chem*, **2010**, *45*, 5767–5772.

42 Alvarez G., Aguirre-lópez B., Cabrera N., Marins E.B., Tinoco L., Batthyány C.I., González M, 4-thiadiazol-5 (4H) -ones : a new class of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase . Study of the mechanism of inhibition. *J Enz Inhib Med Chem*, **2012**, June, 1–9.