



EFFECTO DE LA PROGESTERONA, CORTISOL Y DHEA SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL LTR DEL VIRUS DE MAEDI-VISNA

EFFECT OF PROGESTERONE, CORTISOL AND DHEA ON THE LTR OF MAEDI-VISNA VIRUS TRANSCRIPCIONAL ACTIVITY

Crespo, O., Gómez-Lucía, E., Doménech, A*.

Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

*Correspondencia del autor: domenech@vet.ucm.es

RESUMEN

Estudios previos sugieren que, al igual que en otras infecciones por retrovirus, las hormonas esteroideas serían capaces de dirigir la expresión del virus de Maedi-Visna (MVV) mediante la interacción con los Elementos de Respuesta a Hormona (HRE) de la región promotora/reguladora LTR (Repeticiones Largas Terminales) del genoma del provirus. El objetivo de este trabajo fue la evaluación del efecto del cortisol, progesterona y dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la capacidad transcripcional de la región LTR de MVV mediante ensayos de transfección en fibroblastos ovinos con plásmidos pAcGFP (que contiene el gen para la GFP, proteína verde fluorescente) en los que se había clonado la región U3-cap del LTR de distintas cepas de MVV. La actividad transcripcional del LTR se evaluó a través de la cuantificación de la expresión de la GFP por citometría de flujo con las distintas concentraciones de cada hormona tras 48 horas de incubación. En la mayoría de los ensayos se observó un claro efecto inhibitorio de la transcripción del LTR a elevadas concentraciones hormonales, disminuyendo el efecto a medida que se diluía la hormona, llegando incluso en el caso de cortisol y de DHEA a producirse un incremento de la expresión a partir de 10^{-7} M. En general no se pudo asociar una diferente respuesta con el origen de la cepa estudiada lo que sugiere que no

está relacionado con los distintos orígenes/tropismos de los virus. Estos datos sugieren la presencia de un sitio HRE capaz de responder a estimulación hormonal en el LTR de MVV.

Palabras clave: Virus de Maedi-Visna (MVV), Repeticiones Largas Terminales (LTR), Elemento de Respuesta a Hormona (HRE), hormonas esteroideas.

SUMMARY

Previous studies suggest that steroid hormones may direct the expression of Maedi-Visna virus (MVV), as has been observed in other retroviral infections. This would be achieved through the promoter/regulator region of the LTR (long terminal repeats) of the proviral genome, which would contain hormone responsive elements (HRE). The aim of this study was to evaluate the effect of cortisol, progesterone and dehydroepiandrosterone (DHEA) on the transcriptional ability of the MVV LTR region. For this, sheep fibroblasts were transfected with pAcGFP plasmids (containing the gene for green fluorescent protein, GFP) in which the U3-cap region of the LTR of different strains of MVV had been cloned. Different concentrations of each hormone were added to transfected cells and the transcriptional activity of the LTR was evaluated after 48 hours of incubation by quantifying the expression of GFP by flow cytometry. A clear inhibitory effect of the transcriptional ability of the LTR was observed in most of the assays at high hormonal concentrations. This effect decreased with the increasing dilutions of the hormones, to the point that GFP expression was above baseline in cells transfected with several of the plasmids and treated with dilutions above 10^{-7} M of cortisol and DHEA. In general terms, a different response could not be associated to the origin of the strain under study, suggesting that the effect of steroids is not related to the different origins/tropisms of the virus. These data suggest the presence of a hormone responsive element (HRE) in the MVV LTR able to respond to hormonal stimulation.

Key words: Maedi-Visna Virus (MVV), Long Terminal Repeat (LTR), Hormone Response Element (HRE), steroid hormones.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Maedi-Visna

La enfermedad Maedi-Visna (MV o neumonía progresiva ovina en español) inicialmente se describió como dos procesos distintos, disnea (en islandés “Maedi”) y pérdida de peso (en

islandés “Visna”), comprobándose posteriormente que estaban producidas por el mismo virus, el Virus de Maedi-Visna (MVV). Este virus es capaz de ocasionar distintos procesos como neumonía intersticial, encefalitis, artritis o mastitis, todos ellos de carácter crónico y progresivo. Aunque la infección persiste de por vida, la expresión y eliminación del virus se relaciona con momentos reproductivos como el parto o la lactación. MVV emplea como células diana monocitos y macrófagos (Narayan *et al.*, 1982; Gendelman, 1985). Ello no quiere decir que sólo sean estas células donde se replica MVV, aunque sí las más importantes.

El virus de Maedi-Visna

MVV es un lentivirus ovino perteneciente a la familia *Retroviridae* que guarda gran similitud con el virus de la encefalitis-artiritis caprina (CAEV) aislado en 1980 por primera vez en EE.UU. a partir de la membrana sinovial de cabras afectadas de artritis, por lo que actualmente se clasifican ambos como Lentivirus de Pequeños Rumiantes (o SRLVs en su denominación inglesa). La partícula vírica es esférica y mide entre 90 y 120 nm de diámetro y contiene dos moléculas idénticas de ARN monocatenario de unos 9-10 Kb con el extremo 5' metilado y el 3' poliadenilado. El complejo genoma-nucleoproteína se asocia a la retrotranscriptasa y queda envuelto por una cápside troncocónica, la cual a su vez se recubre de una envoltura derivada de la célula hospedadora (Figura 1).

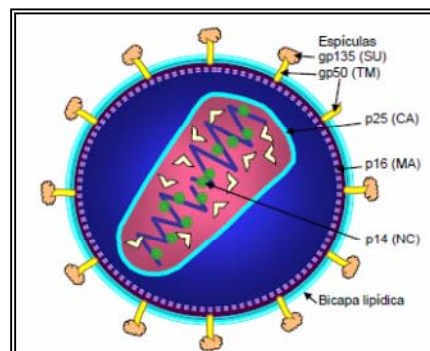


Figura 1. Esquema general de un lentivirus. SU, proteína de superficie, TM, proteína transmembrana, CA, proteína de la cápside, MA, proteína matriz, NC, proteína de la nucleocápside (Tomado de Barquero, 2005).

El genoma de MVV contiene los tres genes esenciales (*gag*, *pol* y *env*) y tres genes reguladores (*vif*, *tat* y *rev*). En el ADN proviral aparecen las repeticiones terminales largas (LTR, “Long Terminal Repeats”), largas secuencias repetidas a ambos extremos que juegan un papel crucial en la transcripción. En los LTR se distinguen tres regiones: U3, R y U5 (Figura 2). Muchos estudios han demostrado la gran importancia de la actividad promotora del LTR, así

como en la regulación de la transcripción y en general en la expresión viral (Kawaguchi *et al.*, 1992; Sparger *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1994; De Parseval y Elder, 1999). Su importancia crucial deriva de que contienen todas las señales requeridas para la expresión génica (promotores, iniciación de la transcripción, señal de poliadenilación, señal de finalización de la transcripción y potenciadores o “enhancers”).

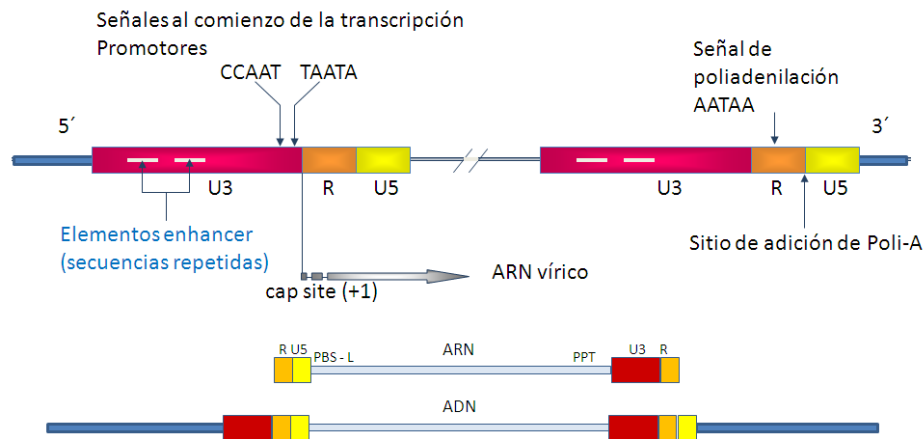


Figura 2. Representación esquemática del LTR.

Efecto de las hormonas esteroideas en retrovirus

Las hormonas esteroideas son un grupo de moléculas presentes en la mayoría de los vertebrados superiores. Derivan del colesterol y su síntesis está controlada por el hipotálamo e hipófisis, la cual envía señales a la glándula adrenal (en la que se sintetizan glucocorticoides como cortisol, mineralcorticoides como la aldosterona, o esteroides masculinos como la DHEA) o a las gónadas (en las que se sintetizan testosterona, estradiol y progesterona). Gracias a su naturaleza lipofílica pueden penetrar en las células donde interactúan con receptores en el citoplasma o núcleo y forman complejos capaces de regular la transcripción de determinados genes tras unirse a secuencias específicas del ADN (Johannes, 2007).

Los receptores reconocen e interactúan con secuencias específicas del ADN, los denominados “elementos de respuesta a hormona” (HRE), localizadas en las regiones promotoras de los genes diana. La interacción del ADN y el receptor facilita la maquinaria transcripcional.

Según la secuencia aminoacídica de su región central los receptores esteroideos se clasifican en dos subfamilias. La de menor tamaño contiene el receptor de glucocorticoides (GR), progesterona (PR), andrógenos (AR) y mineralcorticoides (MR). La otra subfamilia, de mayor

tamaño, contiene al receptor de estrógenos (ER), vitamina D3, hormona tiroidea y ácido retinoico entre otros. La secuencia TGTTCT es la diana correspondiente a la subfamilia del GR/PR, y AGGTCA a la subfamilia del ER (Nelson *et al.*, 1999). Por lo tanto, estas dos subfamilias de HRE determinarán la capacidad funcional de las distintas hormonas esteroideas.

El efecto de las hormonas sobre la replicación de los retrovirus comenzó a despertar gran interés desde el descubrimiento de la estimulación por glucocorticoides de la replicación y liberación del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) describiéndose un elemento de respuesta hormonal en el genoma del virus que se pudo situar en la región LTR (Smoller *et al.*, 1961). Cuando se añadía dexametasona, progesterona, testosterona o mineralcorticoides a cultivos de células infectadas con el MMTV se observó un incremento en el ARN viral (Ringold *et al.*, 1975). El efecto de los esteroides sobre la transcripción se ha comprobado en otros retrovirus como el virus Moloney del sarcoma murino (Miksicek *et al.*, 1986), retrovirus endógenos murinos, virus de la leucemia bovina, retrovirus endógenos porcinos, y virus de la inmunodeficiencia humana o simia (revisado en Tejerizo 2007). En otros estudios en los que se ha estudiado el efecto de las hormonas esteroideas sobre otro retrovirus, el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), se ha observado que la replicación del virus se ve alterada en presencia de estradiol (Bruland *et al.*, 2001; Tejerizo 2007). De forma similar, en estudios preliminares sobre el efecto del estradiol en cultivos de fibroblastos infectados por MVV se observó un incremento de la apoptosis que podría deberse a que la hormona actúe directamente sobre la replicación de la cepa EV1 de MVV y fuese éste el causante directo del desencadenamiento de la apoptosis (Sanjosé, 2010). Se ha visto también que la DHEA inhibe la replicación de FIV en células infectadas por el virus (Bradley *et al.*, 1995). En los retrovirus felinos también se ha estudiado el efecto de la progesterona observándose que los LTRs de los virus de la leucemia felina (FeLV) y FIV cuando son clonados en un vector y en presencia de progesterona, conducen la expresión proteica (Tejerizo, 2007). Por otra parte, se ha descrito un nivel diferente de hormonas esteroideas en sangre de gatos infectados por FeLV, FIV o ambos en comparación con gatos no infectados, lo que sugiere un papel en la patogenia de estas enfermedades (Tejerizo *et al.*, 2012).

Durante la enfermedad de Maedi-Visna la expresión del virus puede sufrir alteraciones debidas a situaciones de estrés o a distintos momentos del ciclo reproductivo como el parto o la lactación, reforzándose de esta forma la hipótesis del posible efecto de las hormonas esteroideas sobre la expresión viral. Es posible que, al igual que sucede en otros retrovirus, existan HRE en la región reguladora LTR de MVV, y determinadas hormonas esteroideas puedan regular los

mecanismos de transcripción génica del virus tras la unión del complejo hormona-receptor al sitio HRE diana.

Dada la importancia que tiene la enfermedad de Maedi-Visna en Sanidad Animal con su influencia sobre la economía agroganadera, nos propusimos como objetivo general de este trabajo estudiar el efecto de determinadas hormonas esteroideas (hormonas sexuales y glucocorticoides, específicamente progesterona, cortisol y DHEA) sobre la expresión del virus de Maedi-Visna. Para ello se pretende caracterizar el papel de los LTRs víricos en la respuesta a estas hormonas mediante ensayos de transfección con plásmidos en los que se ha clonado la región U3-cap de los LTR de cepas de distintos orígenes y cuantificación de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en fibroblastos ovinos incubados en presencia de estas hormonas esteroideas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Células empleadas y condiciones de cultivo

En este trabajo se han empleado fibroblastos ovinos, un cultivo celular primario aislado de tejido subcutáneo de ovejas no infectadas. El medio de cultivo empleado fue siempre RPMI-1640 (BioWhittaker) con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, España), L-glutamina 200 mM (Sigma-Aldrich, España), penicilina (100 UI/ml) (PPA) y estreptomycin (100 µg/ml) (PAA). La incubación se realizó a 37°C con 5% de CO₂ en atmósfera húmeda.

Plásmidos empleados y análisis de sus secuencias nucleotídicas

Todos los plásmidos recombinantes fueron realizados por la licenciada Leticia Sanjosé en colaboración con el Grupo de investigación de la Dra. Amorena (IdAB, CSIC-UPNA). Los insertos correspondientes de las distintas secuencias de LTR así como sus secuencias nucleotídicas (U3-cap) de las 5 cepas de MVV fueron cedidos amablemente por el citado Grupo de Investigación. Se eligió el vector pAcGFP para confeccionar cada plásmido y poder estudiar la actividad promotora porque este vector carece de promotores propios, por lo que la expresión de GFP dependerá de que se active o no la maquinaria transcriptor en el LTR (Figura 3). Esto permite determinar la actividad promotora de dicha región tras la transfección en los fibroblastos. Además, la expresión de GFP se mide mediante citometría de flujo, con la ventaja de conocer exactamente la intensidad de la expresión en cada célula en particular y de la

población celular en general, al medir la fluorescencia inducida por GFP. Esto permite distinguir las células transfectadas y contarlas.

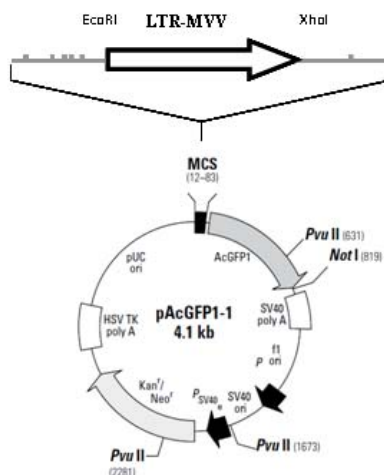


Figura 3. Esquema del plásmido recombinante resultante de la clonación de la secuencia U3-cap del LTR de cada cepa de MVV en la región MCS del vector pAcGFP-1 (pAcGFP/LTR).

Para la realización del estudio se seleccionaron 5 cepas distintas de MVV: EV1 con y sin repeticiones (Número de acceso GenBank S51392.1), 697, 258, KV1772 y 496 a fin de estudiar si había diferencias en su respuesta a hormonas en función del cuadro clínico que originaban (nervioso, neumónico o artrítico), no pudiendo disponer de ninguna cepa aislada de un caso mamario (Tabla 1). Se escogió el fragmento U3-cap debido a que la región U3-R del LTR contiene la mayoría de los sitios de unión de factores de transcripción necesarios para la actividad promotora del LTR.

Tabla 1. Cepas de MVV cuyos LTR se emplearon en el estudio mostrando en cada caso su origen. ^aCon repeticiones, presencia de dos secuencias repetidas, una de 19 pb (CTTAAGTCATAACCGCAAT) en posición 181 a 200, y una secuencia de 23 pb (GCGCATAGTCATGTATCAGCTGA) en posición 201 a 222. ^bSin repeticiones.

Cepa	Origen	Referencia
EV1 con repeticiones ^a	Neumónico	Sargan <i>et al.</i> , 1991
EV1 sin repeticiones ^b	Neumónico	Sargan <i>et al.</i> , 1991
258	Neumónico	Glaria <i>et al.</i> , 2009
KV1772	Nervioso	Andresson <i>et al.</i> , 1993
697	Nervioso	Glaria <i>et al.</i> , 2011
496	Artrítico	Glaria <i>et al.</i> , 2009

El análisis de las secuencias nucleotídicas se llevó a cabo mediante el programa de alineamiento clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y la identificación de los posibles HRE situados en la región LTR del genoma proviral de MVV se realizó con los programas Bioedit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y Genomatix (transcription factor binding sites) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Hormonas empleadas y su dilución

Las hormonas incluidas en el estudio fueron progesterona, cortisol y dehidroepiandrosterona (DHEA) (Sigma-Aldrich, España). Para los ensayos todas las hormonas fueron diluidas en agua milli-Q ($\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$) estéril hasta una concentración de 2×10^{-2} M, excepto la DHEA que requirió solventes orgánicos recomendados por el fabricante, cloroformo:etanol:ácido acético (2:2:1). Todas las diluciones “stock” fueron alicuotadas y almacenadas a -20°C hasta su uso. En el momento de realizar los experimentos se prepararon diluciones decimales seriadas a partir de estas soluciones con medio RPMI 1640 (BioWhittaker) (añadiéndose además en el caso de DHEA, 3mg/ml de glucosa -Conda, S. A., España-) empleándose las concentraciones 10^{-3} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-11} M y 10^{-13} M.

Crecimiento de bacterias y extracción de ADN plasmídico

Las bacterias de *Escherichia coli* Top10 previamente transformadas con cada uno de los plásmidos recombinantes y almacenadas a -80°C en proyectos anteriores, eran descongeladas en baño a 37°C y cultivadas a 37°C en placas de agar con LB (Conda, S. A., España) con Kanamicina (25 $\mu\text{l/ml}$) (Sigma-Aldrich, España), ya que así se seleccionan las cepas con el gen de resistencia para este fármaco. Tras 24 horas de incubación se seleccionaban colonias y se pasaban a cultivar en caldo LB con Kanamicina (25 $\mu\text{l/ml}$), incubándolas 24 horas más a 37°C en agitación. Seguidamente se procedía a realizar la extracción del plásmido según el protocolo de QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). El ADN plasmídico extraído se corría en gel de agarosa al 1% (Conda, S. A., España) en TAE 1x al que se añadía GelRedTM (Biotium) (10 $\mu\text{l}/10\text{ml}$) y se visualizaba con luz ultravioleta mediante el sistema de captación de imágenes GelDocTM y el software de análisis de geles Quantity-One® (Bio-Rad Laboratorios, S.A. España). El ADN extraído se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific) y se conservó a -20°C hasta su uso.

Transfección celular

Una vez extraído el ADN plasmídico, para la consecución del experimento y como primer paso era necesario transfectar los fibroblastos. Para ello se incubaron 100.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos (Iwaki Microplate), en un volumen final de 800 μ l de medio RPMI 1640 completo sin antibióticos. Tras 24 horas de incubación las células alcanzaban una confluencia del 75-80% y se procedió a la transfección de las células con 0,4 μ g de plásmido purificado (pAcGFP/LTR) mediante el empleo de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con una relación de ADN (μ g): Lipofectamina (μ l) de 1:2 siguiendo las recomendaciones del fabricante y según el protocolo descrito.

Los cultivos transfectados se incubaron durante 6 horas para obtener una adecuada transfección. Posteriormente, se procedió a la adición de 100 μ l de cada hormona en estudio (progesterona, cortisol o DHEA) por pocillo, para obtener concentraciones finales de 10^{-3} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-11} M y 10^{-13} M, en un volumen final de 1 ml. Los cultivos se incubaron en estas condiciones 48 horas. Pasado este tiempo se tripsinizaban y fijaban las células con paraformaldehído (PFA) al 0,5% para al día siguiente realizar el análisis por citometría de flujo. Cada experimento con cada hormona se realizó por duplicado repitiéndose al menos dos veces.

En cada experimento se incluyeron una serie de controles:

- Blanco: células sin adición de lipofectamina ni hormona en el medio.
- Controles internos de células transfectadas con cada plásmido con lipofectamina pero sin adición de hormona, para determinar como referencia la expresión basal de la proteína GFP en presencia de LTR.
- Control de la transfección mediante el plásmido que incluye pAcGFP-CMV (vector con el promotor del citomegalovirus).

Análisis de la actividad transcriptor del LTR mediante citometría de flujo

La detección de la expresión de GFP se realizó por citometría de flujo en el Centro de Citometría de Flujo de la UCM. La lectura se llevó a cabo en un citómetro FACScalibur con un espectro de excitación de 488 nm y filtros de detección de 515 nm y 585 nm, midiendo la cantidad de 6×10^3 células. Para que los datos obtenidos de expresión de la GFP a las distintas concentraciones de hormona fuesen tomados como válidos se estimó que la transfección obtenida o valor M1 % (porcentaje de células vivas que expresan GFP respecto al total) debería ser de al menos del 12%. Además se tomaron los valores de M1 media (mean) que representa la media de intensidad GFP de la población de células M1.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos para cada concentración de hormona y plásmido fueron normalizados restando a cada valor la media obtenida del valor tomado como basal de expresión (valor obtenido en los controles a los que se añadió sólo lipofectamina más el plásmido) para poder determinar de esta forma el aumento o disminución de la expresión al añadir una determinada concentración de hormona. Cada concentración de hormona se ensayó al menos cuatro veces. A continuación se calculó la desviación estándar para cada bloque de resultados de cada concentración y plásmido.

Para la valoración y estudio estadístico de los resultados se realizó la prueba paramétrica T-Student. Se consideraron como diferencias estadísticamente significativas aquéllas en las que $p < 0,05$.

RESULTADOS

Alineamiento de las secuencias de LTR estudiadas y localización de los principales lugares de unión a factores celulares de transcripción (TBS) y elementos de respuesta a hormona (HRE)

Se identificaron varios sitios de reconocimiento de complejos hormona-receptor hormonal (ER y GR/PR), con distintos grados de conservación en las secuencias (Figura 4). Las secuencias ER1 y GR/PR3 han sido propuestas por el programa Genomatix (*transcription factor binding sites*) y las secuencias ER2 y GR/PR1 y 2 por Tejerizo, 2007. Se localizaron además los principales sitios de regulación de la transcripción (GAS, TAS y TATA box, AP1, AML y AP4) (Figura 4).

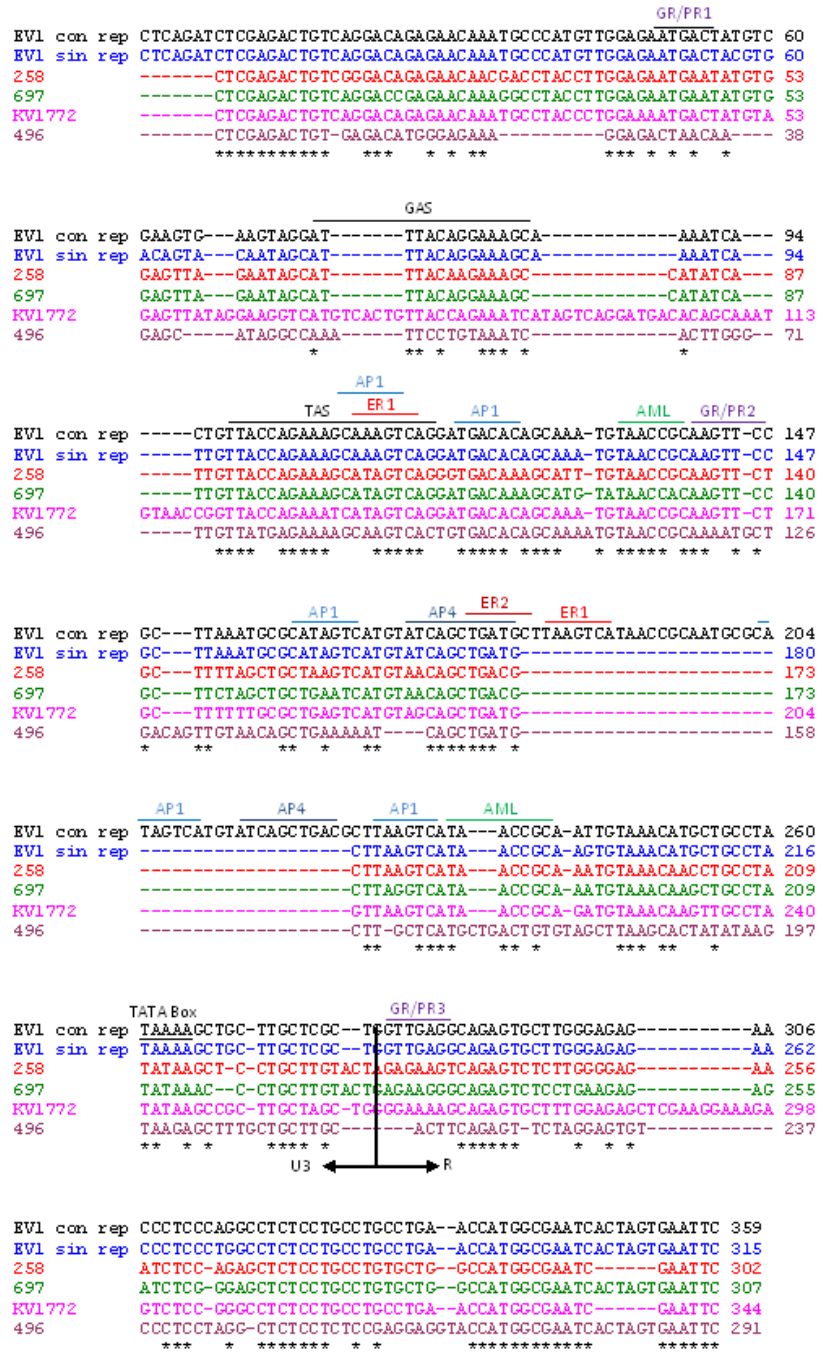


Figura 4. Alineamiento de la secuencia U3-cap de la región LTR de las cepas EV1 con repeticiones (EV1 con rep.), EV1 sin repeticiones (EV1 sin rep.), 258, 697, KV1772, y 496. Los asteriscos representan identidad con EV1 con repeticiones y los guiones deleciones. Los principales sitios de regulación de la transcripción se muestran subrayados (GAS, TAS y TATA box) y sobrescritos (AP1, AML y AP4). Además se muestran como posibles elementos de respuesta a estrógenos (ER1 y ER2), glucocorticoides (GR) y progesterona (PR1, PR2 y PR3).

Análisis del efecto de progesterona, cortisol y DHEA sobre la expresión de GFP en los fibroblastos transfectados

Los resultados normalizados de la expresión de GFP en los cultivos de fibroblastos ovinos transfectados con cada plásmido e incubados con cada concentración de hormona se muestran en la Figura 5, en las que se señalan también las concentraciones hormonales entre las que hay diferencias significativas. No se pudieron obtener resultados para la cepa 496 incubada con DHEA debido a que el porcentaje de transfección medio fue inferior al 12%. A la vista de los resultados obtenidos por esta técnica, en general se observa un efecto inhibitorio sobre la región promotora U3-cap del LTR a las concentraciones más altas (10^{-3}M y 10^{-5}M) de todas las hormonas esteroideas estudiadas (progesterona, cortisol y DHEA) atenuándose este efecto a medida que la concentración se va disminuyendo en la mayoría de los resultados obtenidos. En el caso de la progesterona el efecto inhibitorio se observó a casi todas las concentraciones estudiadas, aunque sólo hubo diferencias estadísticamente significativas entre 10^{-3}M y 10^{-5}M y el resto de concentraciones, excepto en el caso de la cepa KV1772, en donde sólo fue significativa la diferencia entre 10^{-3}M y las demás (Figura 5A).

Al igual que la progesterona, el cortisol también inhibió la expresión de GFP a 10^{-3}M y 10^{-5}M de manera significativa. Sin embargo, a diferencia de la progesterona, en la cepa 258 hubo incremento de la expresión a partir de 10^{-7}M , lo que en la cepa KV1772 ocurrió a partir de 10^{-9}M . En la cepa EV1 sin repeticiones el incremento de expresión de GFP se produjo a 10^{-7}M y 10^{-9}M (Figura 5B). El incremento de expresión también se observó en los cultivos con DHEA con las cepas 258 y KV1772, pero no con la cepa EV1 sin repeticiones (Figura 5C).

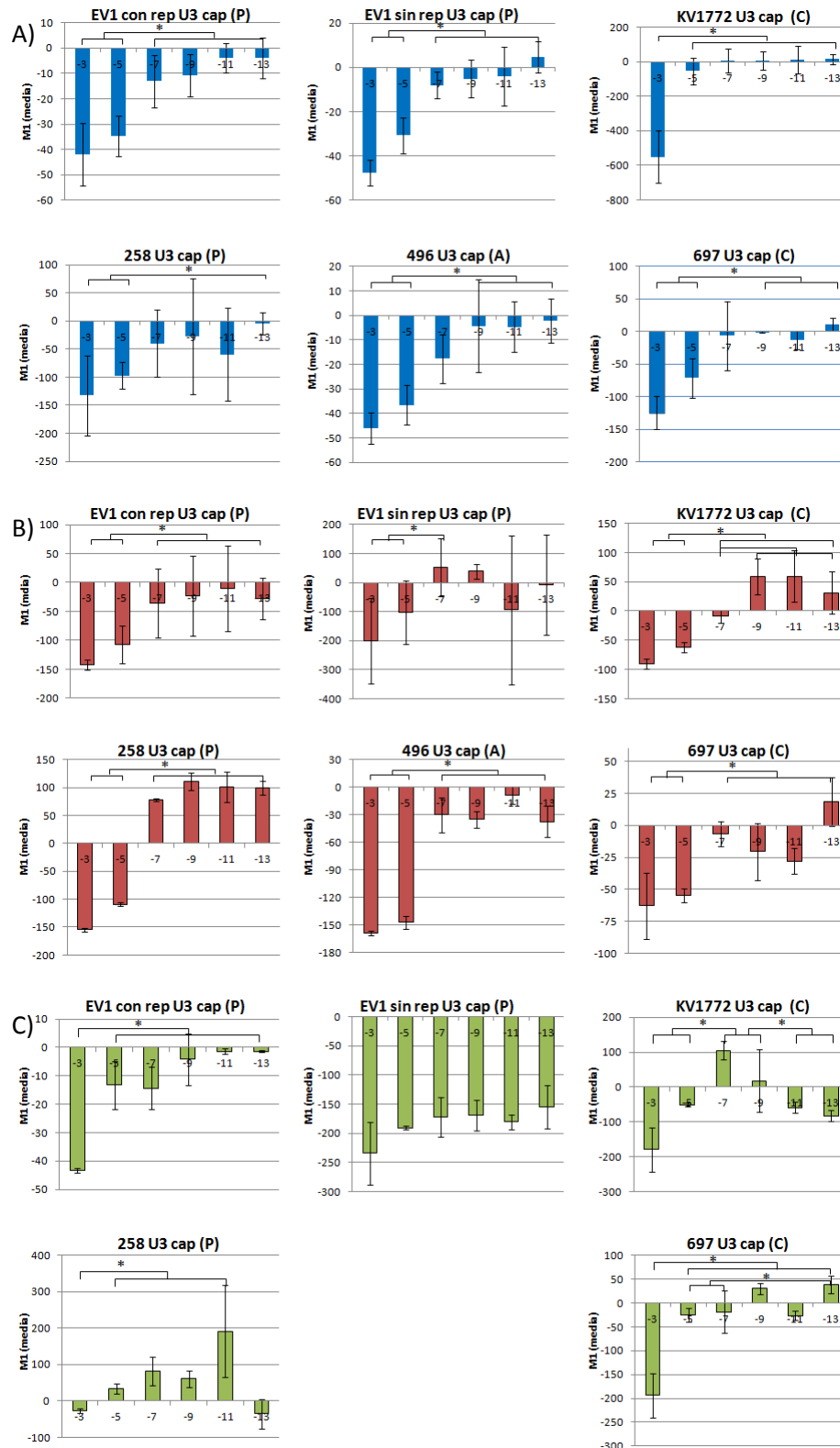


Fig. 5. Efecto de la progesterona (A, barras azules), cortisol (B, barras rojas) y DHEA (C, barras verdes) (concentraciones entre 10^{-3} M y 10^{-13} M) sobre la media de intensidad de GFP expresada de la población de células M1 (M1 media) transfectadas con cada plásmido tras 48 horas de exposición a la hormona. Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron al menos dos veces. Cada barra representa la M1 media obtenida tras restarle el valor tomado como basal (M1 media sin adición de hormona) representándose además en cada una las barras del error estándar (desviación estándar). Además se señalan mediante corchetes los valores de concentración de hormona entre los que hay diferencias significativas. P, cepa de origen pulmonar; A, cepa de origen artrítico; C, cepa de origen cerebral.

DISCUSIÓN

El presente trabajo fue diseñado para analizar si los incrementos de expresión de MVV observados durante el parto y la lactación (Lerondelle *et al.*, 1995) podrían deberse a variaciones en las concentraciones de hormonas en el momento del parto (progesterona/estradiol) o en situaciones de estrés (cortisol).

Según las secuencias analizadas de la región U3-cap de las cepas estudiadas, el posible elemento de respuesta a glucocorticoides y progesterona GR/PR1 coincide en las cepas EV1 y KV1772; 258 y 697, y es distinto a las demás en la cepa 496. En el caso de GR/PR2 la secuencia es idéntica entre las cepas EV1 y 697; 258 y KV1772, siendo de nuevo distinto a las demás en la cepa 496. En GR/PR3 todas las secuencias son distintas entre sí. Por tanto, no existe un patrón común que pudiera explicar las diferencias y similitudes observadas en los ensayos de transcripción. Por otra parte, ya que el receptor para progesterona y cortisol es el mismo, cabría esperar que la respuesta a estas dos hormonas por la misma cepa fuera igual, lo que no se cumple especialmente en los casos de KV1772, ni de 258. Esto podría ser debido a otros factores no contemplados en el estudio como la implicación de otros HRE en otras zonas del genoma o aún no identificados en la región LTR. Además, en la expresión del virus podrían afectar ciertos mecanismos regulatorios de la célula hospedadora. También es posible que la afinidad por el HRE de cada hormona sea distinta o que tras la interacción de una determinada hormona se implique la activación de una cascada metabólica distinta a la que se produciría con la interacción de otra hormona de distinta naturaleza. Es importante mencionar que esta disparidad de resultados con progesterona y con cortisol se observó también en estudios con LTR de FIV y de FeLV (Tejerizo, 2007).

La expresión y eliminación de los virus en la infección por MVV se relaciona con los momentos reproductivos como el parto o lactación (Lerondelle *et al.*, 1995). Así, se ha observado un aumento de los monocitos infectados en sangre y de macrófagos infectados en leche durante el parto (Ouzrout y Lerondelle, 1990). Incluso existen estudios en los que se consigue la reactivación vírica tras inducir la lactación mediante la administración de estradiol y progesterona (Morin *et al.*, 2003). También en machos se ha comprobado que la eliminación del virus en el semen es intermitente, sugiriendo la existencia de un efecto estacional en el patrón de excreción. Se ha visto como el mayor número de eyaculados positivos coincide con el periodo óptimo de la cría, momento de máxima actividad sexual y estrés (Peterson *et al.*, 2008). Se ha demostrado, además, que la dexametasona (glucocorticoide sintético) aumenta la expresión de proteínas virales y el número de partículas infectivas al administrarla a células transfectadas con

un vector retroviral (Solodushko *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que los niveles de progesterona en la oveja se mantienen elevados durante la gestación, alcanzando valores de hasta 15,5 ng/ml (5×10^{-8} M) y que descienden justo antes del momento del parto, los resultados obtenidos para esta hormona en principio se podrían correlacionar de forma directa con este hecho en las cepas EV1 (con y sin repeticiones), 258 y 496 ya que a concentraciones de 10^{-9} M o superiores producirían la inhibición de la expresión vírica durante la gestación para pasar a una ausencia o a una inhibición mucho menor de la expresión vírica justo antes del parto y durante el mismo. En el caso de los glucocorticoides (cortisol en nuestro estudio) al comienzo del parto alcanzan su máximo nivel de 38,5 ng/ml (10^{-7} M) ya que van a intervenir en la lactación, al igual que la prolactina (Chamley *et al.*, 1973). En dos cepas (EV1 sin repeticiones y 258) la expresión de GFP se incrementó precisamente a la concentración de 10^{-7} M, por lo que estos resultados también apoyarían la observación de mayor expresión de MVV tras el parto (Lerondelle *et al.*, 1995).

Atendiendo a los distintos orígenes de las cepas (nervioso, artrítico o neumónico) no se pudo establecer un distinto patrón de inhibición según el mismo, ya que aunque las cepas 697 y KV1772 (ambas de origen nervioso) se comportaron de forma similar con las tres hormonas, no se diferenciaron aparentemente del comportamiento seguido por las cepas de otros orígenes (496 de origen artrítico y 258 y EV1 de origen neumónico). De esta forma, se podría afirmar que de forma general no se puede asociar una distinta respuesta según el origen de las distintas cepas estudiadas, sugiriéndose la falta de relación con los distintos orígenes/tropismos de los virus. Sin embargo, se ha visto como los LTRs son de especial relevancia en determinar el tropismo celular en el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y en el virus de la inmunodeficiencia felina (Payne *et al.*, 1999). Además se ha demostrado como el tropismo celular de MVV está determinado por los LTR (Agnarsdóttir *et al.*, 2000). Sin embargo, Murphy y colaboradores no hallaron que las diferencias de tropismo en CAEV estuvieran relacionadas con la secuencia del LTR de los aislados analizados (Murphy *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

En la mayoría de las cepas se observó un claro efecto inhibitorio de la expresión de la GFP a elevadas concentraciones de progesterona, cortisol y DHEA. En el caso del cortisol, en determinadas cepas hubo incremento de la expresión a concentraciones compatibles con los incrementos fisiológicos que se producen tras el parto y durante la lactación. Asimismo se podría relacionar un aumento de la expresión durante el parto con un descenso de los niveles de

progesterona en sangre. En general no se pudo asociar una diferente respuesta con el origen de la cepa estudiada, lo que denota la falta de relación de los resultados con el origen/tropismo del virus. Los datos demuestran la funcionalidad del HRE en el LTR de MVV sugiriendo la presencia de uno o varios sitios capaces de responder a estimulación hormonal (similar a HRE) en el LTR de MVV.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos enormemente la cesión de los plásmidos recombinantes realizados por Leticia Sanjosé en colaboración con el Grupo de investigación de la Dra. Amorena (Instituto de Agrobiotecnología del CSIC-UPNA), así como de las correspondientes secuencias nucleotídicas de los LTR (U3-cap). Los fibroblastos ovinos fueron igualmente cedidos por la Dra. Amorena. El trabajo ha sido realizado en el Laboratorio del Grupo de Investigación-UCM “Retrovirus Animales” del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria. Ha sido financiado a través de los proyectos AGL2008-04240/GAN del Plan Nacional de I+D (Ministerio de Ciencia y Tecnología) y por los proyectos UCM 920620 GR35/10-A. 2011 (Grupo de investigación-UCM de Retrovirus Animales”, Programa de creación y consolidación de Grupos de Investigación BSCH-UCM).

BIBLIOGRAFÍA

- Andrésson, OS., Elser, JE., Tobin, GJ., Greenwood, JD., Gonda, MA., Georgsson, G., Andrésdóttir, V., Benediksdóttir, E., Carlsdóttir, HM., Mäntylä, EO. (1993). Nucleotide sequence and biological properties of a pathogenic proviral molecular clone of neurovirulent visna virus. *Virology* 193(1): 89-105
- Agnarsdóttir, G., Thorsteinsdóttir, H., Óskarsson, T., Matthíasdóttir, S., Hflidadóttir, B., Andrésson, O., Andrésdóttir, V. (2000). The long terminal repeat is a determinant of cell tropismo of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 81, 1901-1905
- Barquero, N. (2005). Estudio epidemiológico y de métodos diagnósticos de lentivirus de pequeños rumiantes (MVV y CAEV). Departamento de Sanidad Animal. Facultad de veterinaria. Universidad Complutense de Madrid
- Bradley, WG., Kraus, LA., Good, RA., Day, NK. (1995) Dehydroepiandrosterone inhibits replication of feline immunodeficiency virus in chronically infected cells. *Vet Immunol Immunopathol* 46 (1-2): 159-168
- Bruland, T., Dai, HY., Lavik, LAS., Kristiansen, LI., Dalen, A. (2001) Gender-related differences in susceptibility, early virus dissemination and immunosuppression in mice infected with Friend murine leukaemia virus variant FIS-2. *J Gen Virol* 82: 1821-1827

- Chamley, WA., Buckmaster, JM., Cerini, ME., Gunning, IA., Goding, JR., Obst, JM., Williams, A., Winfield, C. (1973). Changes in the Levels of Progesterone, Corticosteroids, Estrone, Estradiol-17, Luteinizing Hormone, and Prolactin in the Peripheral Plasma of the Ewe During Late Pregnancy and at Parturition. *Biol Reprod* 9, 30-35
- De Parseval, A. and Elder, JH. (1999) Demonstration that orf2 encodes the feline immunodeficiency virus transactivating (Tat) proteína and characterization of a unique gene product with parcial rev activity. *J Virol* 73 (1); 608-617
- Gendelman, HE., Narayan, O., Molineaux, S., Clements, JE., Ghotbi, Z. (1985). Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82(20):7086-90
- Glaria, I., Reina, R., Ramirez, H., De Andrés, X., Crespo, H., Jauregui, P., Salazar, E., Luján, L., Pérez, MM., Benavides, J., Pérez, V., Polledo, L., García-Marín, JF., Riezo, JI., Borrás, F., Amorena, B., De Andrés, D. (2012). Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Vet Microbiol* 155(2-4): 137-146
- Johannes, LT. (2007). *Oncogenic Viruses Research Trends*. Nova Biomedical Books. New York.
- Kawaguchi, Y., Norimine, J., Miyazawa, T., Kai, C., Mikami, T. (1992) Sequences within the feline immunodeficiency virus long terminal repeat that regulate gene expression and respond to activation by feline herpesvirus type 1. *Virology* 190: 465-468
- Lerondelle, C., Greenland, T., Jane, M., Mornex, JF. (1995). Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne caprine arthritis encephalitis virus. *J Dairy Sci* 78: 850-855
- Miksicek, R., Heber, A., Schnid, W., Danesch, U., Posseckert, G., Beato, M., Schutz, G. (1986) Glucocorticoid responsiveness of the transcriptional enhancer of Moloney murine sarcoma virus. *Cell* 46 (2): 283-290
- Morin, T., Grézel, D., Bouzar, B., Villet, S., Greenland, T., Guiguen, F., Fornazérx, C., Mornez, JF., Chebloune, Y. (2003). Experimental model of lentivirus reactivation for virological and immunological studies in caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected goats. *Bull Vet Inst Pulawy* 47: 275-286
- Murphy B, McElliott V, Vapniarsky N, Oliver A, Rowe J. (2010). Tissue tropism and promoter sequence variation in caprine arthritis encephalitis virus infected goats. *Virus Res* 151:177-84.
- Narayan, O., Wolinsky, JS., Clements, JE., Strandberg JD., Griffin, DE., Cork, LC. (1982). Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. *J Gen Virol* 59(Pt2): 345-56
- Ouzrout R., Lerondelle, C. (1990). Expression of visna-maedi in the mammary secretions of a seropositive ewe during gestation and then an artificial induction of lactation. *Ann Rec Vét* 21: 69-73
- Payne, SL., La Celle, K., Pei, XF., Qi, XM., Shao, H., Steagall, WK., Perry, S., Fuller, F. (1999). Long terminal repeat sequences of equine infectious anaemia virus are a major determinant of cell tropism. *J Gen Virol* 80, 755-759
- Peterson, K., Brinkhof, J., Houwes, DJ., Colenbrander, B., Gadella, BM. (2008). Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 69: 433-442

- Ringold GM., Yamamoto, KR., Tomkins, GR., Bishop, M., Varmus, HE. (1975) Dexamethasone-mediated induction of mouse mammary tumor virus RNA: a system for studying glucocorticoid action. *Cell* 6(3): 299-305
- Sanjosé, L. (2010). Estudio del efecto del estradiol sobre la apoptosis y la viabilidad de células infectadas por el virus de Maedi-Visna. Trabajo Fin de Máster de Investigación en Ciencias Veterinarias. UCM
- Sanjosé, L., Gómez-Lucía, E., Glaria, E., Reina, R., Ballesteros, N., de Andrés, D., Amorena, B., Doménech, A. (2011). Cortisol and progesterone inhibit the transcriptional activity of the LTR region of the Maedi-Visna virus genome. 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis (Institut Génétique Moléculaire Montpellier, Montpellier (Francia), 2-5 Noviembre 2011
- Sargan, DR., Bennet, ID., Cousens, C., Roy, DJ., Blacklaws, BA., Dalziel, RG., Watt, NJ., McConnell, I. (1991). Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 72(Pt8): 1983-903
- Shors, T. (2009) Understanding Viruses. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts. University of Wisconsin-Oshkosh.
- Smoller, CG., Pitelka, GB., Bern, HA. (1961) Cytoplasmic inclusion bodies in cortisol-treated mammary tumors of C3H/CrGl mice. *J Biophys Biochem Cytol* 9:915-920
- Solodushko, V., Bitko, V., Fouty, B. (2009). Dexamethasone and mifepristone increase retroviral infectivity through different mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(3): L538-45
- Sparger, EE., Shacklett, BL., Renshaw-Gegg, L., Barry, PA., Pedersen, NC., Elder, JH., Luciw, PA. (1992) Regulation of gene expression directed by the long terminal repeat of the feline immunodeficiency virus. *Virology* 187: 165-177
- Tejerizo Sáez, JG. (2007). Efecto de las hormonas esteroideas sobre la expresión de los retrovirus felinos. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense.
- Tejerizo, G., Doménech, A., Illera, JC., Silván, G., Gómez-Lucía, E. (2012) Altered plasma concentrations of sex hormones in cats infected by feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. *Domest Anim Endocrinol* 42 (2) 113-20
- Thompson, JF., Elder, JH., Neil, JC. (1994) Cis- and trans-regulation of feline immunodeficiency virus: identification of functional binding sites in the long terminal repeat. *J Gen Virol* 75: 545-554