

Departamento de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra



instituto de agrobiotecnología
agrobioteknologiako institutua



UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

Departamento de Producción Agraria

Instituto de Agrobiotecnología

Base genética del tropismo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3

Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor, presentada por la Licenciada:

Idoia Glaria Ezquer

Directores:

Dr. Ramsés Reina Arias, Doctor contratado del CSIC y

Dr. Damián F. de Andrés Cara, Investigador Científico del CSIC

Tutor: Dr. Iñigo Lasa Uzcudun

Pamplona/Iruña, 2015

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Presidente

Juan Francisco García-Marín

Departamento de Sanidad Animal
Universidad de León

Secretario

Lluís Luján

Departamento de Patología Animal
Universidad de Zaragoza

Vocal

Beatriz Pacheco

Departamento de Virología y Microbiología
Centro Biología Molecular Severo Ochoa

Suplente

Ignacio José Encío

Departamento de Bioquímica y Biología celular
Universidad Pública de Navarra

Revisores externos

Eduardo Berriatua

Departamento de Sanidad Animal
Universidad de Murcia

Sergio Rosati

Departamento de Ciencias Veterinarias
Universidad de Turín

Suplente

Marta Pérez

Departamento de Anatomía, Embriología y Genética
Universidad de Zaragoza

Dr. RAMSÉS REINA ARIAS, Doctor contratado del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y **Dr. DAMIÁN FERMÍN de ANDRÉS CARA**, Investigador Científico del CSIC,

INFORMAN:

Que la presente memoria de Tesis Doctoral “**Base genética del tropismo de Lentivirus de Pequeños Rumiantes y estudio de la resistencia innata por APOBEC3**” elaborada por IDOIA GLARIA EZQUER ha sido realizada bajo su dirección, y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, lo firman en Pamplona, a 16 de junio de 2015

Fdo.: Ramsés Reina Arias

Fdo.: Damián F. de Andrés Cara

*“No es el más fuerte ni el más inteligente el que sobrevive,
sino aquél que más se adapta a los cambios”*

Charles Darwin

A mi ama

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que de un modo u otro han hecho posible la realización de este trabajo.

A la Universidad Pública de Navarra, al Gobierno de Navarra y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en especial al Instituto de Agrobiotecnología y al Departamento de Producción Agraria.

A la Dra. Beatriz Amorena Zabalza por darme la oportunidad de investigar y trabajar en su equipo y al Dr. Damián F. de Andrés Cara por confiar en mí antes que yo misma. Gracias a los dos por vuestro apoyo en todos estos años.

Al Dr. Ramsés Reina Arias, Ram, por su amistad, compañerismo y dirección, en ese orden. Sin ti este trabajo no hubiera sido posible. A la Dra. Helena Crespo Otano, Helitas, por todos los “periplos” por los que hemos pasado juntas. Por compartir conmigo todas las alegrías y penas que nos ha deparado la vida, maite zaituztet Trebolito.

Al Dr. Yahia Chebloune por acogerme en su laboratorio como una más de su grupo, por su cariño y buena disposición. A Bilel por hacerme más fácil y divertida la estancia en Grenoble.

Al Dr. Iñaki Encío Martínez y a la Dra. Esperanza Gómez Lucía por sus consejos y las técnicas que aprendí en sus laboratorios.

A tod@s l@s BAZ que he tenido el inmenso placer de tener como compañer@s, que no nombro por temor a dejarme alguno; por esas jornadas maratonianas en cultivos y en la nave de la ovejas, comidas en el Sario, congresos, locuras y buenos momentos compartidos tanto dentro como fuera del laboratorio. En especial a Lorena, por su alegría y apoyo esencial en la última fase de esta tesis, y a Leti, por su dulzura y cariño. A las kukis, en especial a Bea y Viky, y a los IL, porque habéis hecho de la primera planta una familia, siempre dispuestos a echar una mano y unas risas. A l@s que comenzaron como compañer@s y acabaron siendo grandes amig@s aunque hoy no sigan en el IdAB: Neki e Iker, laister elkar ikusiko dugu Bilbon, y Amaia, un torbellino de amor y vida.

Al resto de l@s compañer@s del Instituto de Agrobiotecnología, por vuestra disposición para compartir cualquier cosa, ya sean dudas científicas, calçotadas, calderetes, gynkanas o conversaciones de todo tipo en la sala del café.

A todo el apoyo técnico de l@s chic@s del SAI. A Maite por su energía. A Mari Jose y a Victor por estar siempre dispuestos a ayudar y con una sonrisa en la cara, y sobre todo por haber sabido entenderme y apoyarme en los últimos tiempos. A Fernando Armona y Fernando Zaratiegui por su ayuda con los “papeleos”.

A toda mi gente de Burgui, vía de escape siempre que tengo oportunidad. A mi queridísima “cuadrilla”, que aunque no todas entiendan este loco mundo de la ciencia han estado siempre conmigo: Silvia, Ana, losune, Maider, Natalia, y en especial a mi compi en todas nuestras aventuras, Elena. Juntas hemos crecido, reído, llorado, aprendido, cuidado,... Neskak, ikaragarriak zarete!

A mis amigas desde la universidad Arantza y Ana, aunque nos veamos mucho menos de lo que quisiéramos sabemos que nos tenemos.

A mis tíos, tías y primukis por preocuparse por mí y estar siempre a mi lado. Es una suerte formar parte de esta familia “pantunfla” con la que tan buenos ratitos paso en el banco de la panadería, echando una galimba o yendo a patinar. Y a los que por ley de vida o por desgracia ya nos dejaron; Marifí y Ramón, gracias por vuestra fortaleza, coherencia, alegría y ganas de vivir. Nire bihotzean betirako.

A Guillermo y Xabi, por querernos tanto y saber que estamos siempre ahí para lo que sea, sois los mejores hermanos que podía tener. A Kris, por ser una gran cuñada, fuerte y comprensiva, y habernos regalado lo más bonito de este mundo, mi sobrina Katrin.

A mis padres Sixto y Conchi, por su amor y por enseñarme a que el esfuerzo merece la pena y a valorar las pequeñas cosas. Por darme la oportunidad de elegir mi camino y apoyarme siempre. Os quiero.

A Igor, por quererme tal y como soy y no ponerme condiciones, por su optimismo, sinceridad y tirar de mí en los momentos difíciles. Por ser el sol en los días de nube gris. Maite zaitut bihotza.

Muchísimas gracias a tod@s. Eskerrik anitx guzoi.

Idoia Galaria Ezquer agradece las becas/contratos otorgados que han permitido la realización de este trabajo de investigación, a las siguientes instituciones:

- Universidad Pública de Navarra. Contrato de Trabajo de Obra o Servicio para la realización de un Proyecto de Investigación. 2006-2010.
- Universidad Pública de Navarra. Beca/contrato del Programa de Ayudas para la Formación de Personal Investigador. 2010-2012.
- Universidad Pública de Navarra. Ayudas complementarias a tesis. Convocatorias 2010-2012.
- Universidad Pública de Navarra. Ayudas a la movilidad para estancias breves predoctorales. Convocatoria 2010. Estancia en el laboratorio del Dr. Yahia Chebloune, Institut Jean Roget, Grenoble (Francia).

Este trabajo ha sido realizado dentro de los siguientes proyectos de investigación:

CICYT: AGL2003-08977-C03-01 “Nuevas estrategias de vacunación, diagnóstico y epidemiología para el control del Virus Maedi Visna”. Investigadora responsable: Dra. Beatriz Amorena Zabalza.

CICYT: AGL2006-13410-C06-01/GAN "Virus Maedi Visna: Diagnóstico, patogenia, genética y epidemiología". Investigadora responsable: Dra. Beatriz Amorena Zabalza.

CICYT: AGL2007-66874-C04-01/GAN “Factores genéticos, inmunológicos y epidemiológicos implicados en la patogenicidad del Maedi Visna ovino”. Investigadora responsable: Dra. Beatriz Amorena Zabalza.

Gobierno de Navarra: Nº IIQ010449.RI1 “Proteínas recombinantes para la detección serológica de la infección por el Virus Maedi Visna”. Investigadora responsable: Dra. Beatriz Amorena Zabalza.

CICYT: AGL2010-22341-C04-01 “Inmunidad innata y adquirida frente a Lentivirus de Pequeños Rumiantes: Elementos responsables del tropismo viral y de la presentación clínica de la enfermedad”. Investigadora responsable: Dra. Beatriz Amorena Zabalza.

Gobierno de Navarra: Nº IIQ14064.RI1 “Patogenómica traslacional en el estudio de enfermedades infecciosas con implicaciones económico-sanitarias en especies productivas”. Investigadora responsable: Dra. Beatriz Amorena Zabalza.

La presente Tesis Doctoral está organizada según el modelo sugerido por la Comisión de Doctorado del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra. De esta manera, los resultados obtenidos durante la realización de la misma se agrupan en capítulos, que se corresponden con los artículos científicos a los que han dado o darán lugar el desarrollo de los objetivos planteados.

Así, cada capítulo contiene su propio resumen, una introducción específica, la descripción de los materiales y métodos utilizados, los resultados obtenidos, la discusión de los mismos y por último, la bibliografía que le corresponde. Por lo tanto, cada capítulo agrupa la información necesaria relacionada al tema que en él se desarrolla permitiendo su lectura de manera independiente al resto de los capítulos.

Este documento incluye además distintos apartados: (i) un resumen en español y un summary en inglés; (ii) una introducción general en la que se describen de manera más amplia los lentivirus de pequeños rumiantes y los factores de restricción celulares, concretamente la familia APOBEC3; (iii) los objetivos planteados; (iv) una discusión global respecto a los proyectos futuros de la investigación; y (v) las conclusiones finales obtenidas durante el presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	15
1. LENTIVIRUS	15
1.1. ESTRUCTURA Y GENOMA	17
1.2. CICLO VIRAL	22
2. CLASIFICACIÓN	25
2.1. VARIABILIDAD GENÉTICA	25
2.2. CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA	26
2.3. BIOLOGÍA DEL VIRUS	28
3. TROPISMO	30
3.1. TROPISMO POR ESPECIE	31
3.2. TROPISMO TISULAR	32
3.3. TROPISMO CELULAR	34
4. MÉTODOS DE CONTROL	36
5. DIAGNÓSTICO	38
5.1. DETECCIÓN INDIRECTA POR SEROLOGÍA	39
5.2. DETECCIÓN DIRECTA DEL VIRUS	41
6. PATOGÉNESIS Y FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD	43
6.1. FORMA PULMONAR	46
6.2. FORMA MAMARIA	47
6.3. FORMA ARTICULAR	47
6.4. FORMA NERVIOSA	48
7. RESPUESTA INMUNE INNATA	51
7.1. TRIM5 (TRIPARTITE MOTIF-CONTAINING 5)	54
7.2. TETERINA (BST-2 o CD317)	56
7.3. APOBEC3 (CEM15)	58
7.3.1. MECANISMOS DE ACCIÓN	60
7.3.2. NEUTRALIZACIÓN MEDIANTE VIF VIRAL	64
7.3.3. EVOLUCIÓN DE LOS LENTIVIRUS	65
7.3.4. APOBEC3A	67
7.3.5. APOBEC3 OVINO	72
REFERENCIAS	74
OBJETIVOS	95
CHAPTER I	99
ABSTRACT	99
INTRODUCTION	100
MATERIALS AND METHODS	101
RESULTS	105
DISCUSSION	123

ACKNOWLEDGEMENTS.....	127
REFERENCES	127
<u>CHAPTER II</u>	135
ABSTRACT	135
INTRODUCTION	136
MATERIALS AND METHODS	137
RESULTS	142
DISCUSSION	151
CONCLUSIONS	154
CONFLICT OF INTEREST STATEMENT	154
ACKNOWLEDGEMENTS.....	154
REFERENCES	155
<u>CHAPTER III</u>	161
ABSTRACT	161
INTRODUCTION	162
MATERIAL AND METHODS.....	164
RESULTS	170
DISCUSSION	184
ACKNOWLEDGEMENTS.....	188
REFERENCES	189
<u>PROYECTOS FUTUROS</u>	195
<u>CONCLUSIONES</u>	209

RESUMEN

RESUMEN

Los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV), que incluyen al virus Visna/Maedi (VMV) y al de la artritis encefalitis caprina (CAEV), infectan ovejas y cabras distribuidas por todo el mundo causando un cuadro multisistémico que afecta articulaciones, pulmones, glándula mamaria y sistema nervioso central. Las pérdidas derivadas de la infección van desde el aumento en la tasa de reposición, a un descenso en las producciones animales o en el valor comercial del rebaño. Aunque la enfermedad causada por los SRLV es de carácter lento y generalmente afecta a pulmones y glándula mamaria en nuestro país, se han descrito brotes epidemiológicos causantes de artritis y encefalitis en ovinos que afectan un gran número de animales, causando pérdidas directas.

En la actualidad existen 5 genotipos descritos (A-E) que presentan una alta variabilidad genética y biológica. Los genotipos A y B a los que pertenecen las estirpes clásicas de VMV y CAEV respectivamente, están distribuidos mundialmente, mientras que los genotipos C y E están restringidos a zonas geográficas concretas.

En ausencia de tratamientos o vacunas totalmente protectoras, las medidas de control se basan en la detección temprana de animales infectados y su posterior eliminación del rebaño. Tras la infección, los animales infectados desarrollan una respuesta de anticuerpos que, si bien no es capaz de eliminar el virus, es indicadora de la infección. Así, empleando métodos de detección serológica podemos diagnosticar la infección indirectamente. Los métodos más eficaces hasta el momento son los ELISAs basados en proteínas recombinantes y péptidos sintéticos. Sin embargo, los métodos disponibles en el comercio están diseñados teniendo en cuenta una única estirpe viral, que sumado a la alta variabilidad antigénica de los SRLV, hace que las medidas disponibles fallen a la hora de controlar todo el espectro antigénico presente.

La organización genómica de los lentivirus está bastante conservada entre los miembros del género. Así, a los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* encargados de codificar proteínas de la cápside, proteínas para la replicación del material genético e integración y las proteínas de la envoltura, respectivamente, hay que sumarles los

accesorios *vpr*, *rev* y *vif* en el caso de los SRLV, todos ellos flanqueados por el regulador de la transcripción viral, la región LTR.

En la patogénesis de las enfermedades lentivirales es esencial conocer las interacciones entre el virus y el hospedador que determinan el tropismo y el desarrollo de los síntomas. Los factores virales incluyen las proteínas de la envoltura, encargadas de unirse al receptor celular y la región LTR encargada de regular la actividad transcripcional. Los factores del hospedador son más diversos ya que pueden incluir todo el fondo genético de una raza o una población determinada capaz de restringir la replicación viral de manera efectiva. Uno de los pasos clave en el establecimiento de la infección es la superación de las barreras de la inmunidad innata, que reconocen directamente determinantes virales e inducen la eliminación del patógeno mediante factores de restricción como APOBEC3.

La caracterización genética y virológica de las estirpes implicadas en los brotes epidemiológicos de artritis y encefalitis, puede aportar hallazgos esenciales en el conocimiento de la relación entre la secuencia genética de los aislados y la capacidad para establecer la infección en un tejido determinado. Por otro lado, componentes de la inmunidad innata del hospedador capaces de inhibir la replicación viral pueden ser también determinantes del tropismo.

Por todo ello en esta tesis nos planteamos los siguientes estudios:

- a) **Aislamiento y caracterización genética de estirpes implicadas en el brote artrítico.** En España se han detectado los primeros casos de artritis en ovinos aunque hasta el momento las secuencias encontradas tanto en ovinos como en caprinos son del tipo virus Visna/Maedi (VMV). Teniendo en cuenta que la artritis es un signo más abundante entre cabras infectadas, es importante determinar si la secuencia genética del virus implicado en la artritis ovina es similar al virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV). Las secuencias encontradas en los animales afectados se agrupaban en el genotipo B2 de SRLV (tipo CAEV), sugiriendo una posible asociación entre el grupo genético y la patología inducida. Además, se obtuvo un aislado cuyo genoma completo semejaba las estirpes de CAEV siendo sólo la integrasa de tipo VMV. Aunque la

región LTR no contenía repeticiones y una deleción en la región R, propuestas como atenuantes de la replicación, el fenotipo observado en cultivos de fibroblastos de piel ovinos fue rápido/alto. El estudio de este brote epidemiológico representa la primera descripción de secuencias de tipo CAEV en ovinos así como la primera estirpe aislada de SRLV en España.

- b) Aislamiento y caracterización genética de estirpes implicadas en el brote de encefalitis.** Se ha descrito un brote extenso en ovinos caracterizado por la presencia de síntomas neurológicos en España. No se conocen las características de los virus implicados y tampoco se dispone de herramientas diagnósticas específicas para dicho brote. Los animales presentaron lesiones en la médula espinal, hecho diferencial del brote, de los que aislamos una estirpe representativa. Las secuencias obtenidas fueron asignadas al genotipo A2/A3 al que pertenecen otras estirpes causantes de encefalitis. La región LTR carecía de repeticiones pero la actividad transcripcional en fibroblastos ovinos resultó ser alta. Sin embargo, los estudios *in vitro* revelaron que la producción viral fue lenta/baja en fibroblastos ovinos pero alta en macrófagos derivados de monocitos sanguíneos. Así, parece que la replicación viral no puede deducirse de la actividad transcripcional del LTR y su asociación puede no ser correcta. Un análisis de los epitopos inmunodominantes de la envoltura de los SRLV implicados en el brote y de otros descritos, condujo al diseño de un péptido sintético con el que desarrollamos un ELISA capaz de detectar los animales afectados por el brote de encefalitis, pero no los afectados por otras formas de la enfermedad. Así generamos una herramienta diagnóstica específica de interés epidemiológico para controlar la diseminación de estas estirpes altamente patogénicas.
- c) Caracterización de la restricción de los SRLV por APOBEC3.** Los factores intrínsecos de la inmunidad innata incluyen la apolipoprotein B editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) que inhibe la replicación viral por diferentes mecanismos, incluyendo la desaminación de citosinas del DNA viral. Los ovinos contienen tres genes APOBEC3 que codifican cuatro proteínas

(A3Z1, A3Z2, A3Z3, A3Z2Z3) con características antivirales aún desconocidas. Empleando monocitos y macrófagos derivados de monocitos sanguíneos, caracterizamos en este trabajo un descenso acusado en la expresión de A3Z1 que coincide con un aumento significativo de la replicación viral. El análisis de los transcritos de A3Z1 reveló la presencia de variantes derivadas de *splicing* (A3Z1Tr) que carecían del dominio citidín desaminasa, responsable de la actividad enzimática. Células homólogas (fibroblastos ovinos) transfectadas con A3Z1 mostraron una reducida producción viral tras la infección con SRLV en comparación con A3Z1Tr. A pesar de ello, no se encontraron signos evidentes de desaminación en las secuencias virales obtenidas. Se detectaron variantes derivadas de *splicing* equivalentes en células humanas y de mono, generalizando la presencia de proteínas A3 truncadas derivadas de *splicing* en primates. La restricción global mediada por A3Z1 podría estar regulada por la expresión génica de isoformas truncadas derivadas de *splicing* que carezcan del dominio citidín desaminasa.

SUMMARY

SUMMARY

Small ruminant lentiviruses (SRLV) include Visna Maedi virus (VMV) and caprine arthritis encephalitis virus (CAEV), infect sheep and goats and are widely distributed around the world causing a multisystemic disease of carpal joints, lungs, mammary gland and central nervous system. Losses derived from SRLV infection range from increased reposition rates in affected flocks to decreased animal production and low commercial value of the flock. SRLV-induced disease is a slow process that affects mainly lungs and mammary gland in sheep from Spain, however new epidemiological outbreaks of arthritis and encephalitis in sheep have affected a high number of animals causing direct losses.

Currently, 5 genotypes (A-E) have been described showing a high genetic and biological variability. Genotypes A and B include classic VMV and CAEV strains respectively, and are widely distributed whereas genotypes C and E are geographically restricted.

In the absence of treatments or protective vaccines, control measures are based on early detection of infected animals and culling. After infection, animals develop an antibody response unable to control viral replication, but indicative of viral infection. Thus, through the application of serological methods infection can be detected. The most currently used method is ELISA based on recombinant proteins and/or synthetic peptides. However, available tools are designed on the basis of a single strain that, together with the high variability present in SRLV hinder the detection of the whole SRLV antigenic spectrum.

Lentiviral genomic organization is quite conserved among viruses within the genus. Thus, structural genes *gag*, *pol* and *env* encode capsid proteins, proteins that replicate and integrate viral genome and envelope proteins, respectively, plus accessory genes *vpr*, *rev* and *vif* in the case of SRLV, all of them flanked by the LTR as transcription regulator.

Host-virus interactions are essential in the development of lentiviral-induced pathogenesis finally determining tropism and disease onset. Viral factors include Env proteins that mediate binding with cellular receptor, and the LTR region due to its

control of transcriptional activity. Host factors may include all the genetic background belonging to a specific breed or animal population able to restrict viral replication efficiently. Transgression of innate immune barriers responsible for the direct recognition and elimination of the pathogen, such as APOBEC3, is one of the key steps to overcome in the establishment of infection.

Genetic and virological characterization of the strains involved in the arthritic and encephalitic outbreaks may provide new insights in the association between genetics and the ability to establish a tissue targeted infection. On the other hand, innate immunity restriction factors, able to inhibit viral replication, are also determinants of viral tropism.

Therefore in this Thesis the following studies were conducted:

- a) **Isolation and genetic characterization of SRLV strains involved in the arthritic outbreak.** In Spain the first cases of arthritis in sheep have been reported being sheep and goat sequences described so far from the Visna/maedi group. Taking into account that arthritis is a common sign in SRLV-infected goats, it becomes important to determine whether the viral genetic sequence involved in the development of ovine arthritis is closely related to the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). Sequences found in affected animals of the outbreak grouped within genotype B2, suggesting a potential association between genetic group and induced pathology. An isolate was obtained and its complete sequence clustered closely related to CAEV, except for the integrase that was more similar to VMV. LTR region did not contain repeats and presented a deletion in R region, both traits proposed as relievers of viral replication, but phenotype in cultured sheep skin fibroblasts was rapid/high. The arthritic outbreak represents the first description of CAEV-like sequences as well as the first isolate of SRLV in Spain.
- b) **Isolation and genetic characterization of SRLV involved in the encephalitis outbreak.** An extended outbreak in sheep characterized by the appearance of neurological signs has been described in Spain. Viruses involved in the outbreak are unknown and specific diagnostic tools unavailable. Animals

presented lesions in the spinal cord, a differential feature of this outbreak, from which a representative strain was isolated. Sequences obtained were grouped in the genotype A2/A3 related to other SRLV strains causing encephalitis. LTR region did not present repeats, but transcriptional activity was high in ovine fibroblasts. However, *in vitro* studies revealed that viral production was slow/low in fibroblasts, but high in monocyte-derived macrophages. Thus, viral replication cannot be deduced from the LTR-transcriptional activity. Analysis of immunodominant epitopes within the Env protein present in animals from the outbreak and others previously obtained led to the design of a synthetic peptide. The ELISA derived from this peptide was able to detect specifically animals affected by the encephalitis outbreak and not those affected with other signs of the infection. Thus, a specific diagnostic tool was generated with epidemiological interest to control especially pathogenic strains.

- c) **Characterization of the SRLV restriction by APOBEC3.** Intrinsic factors of the innate immune response include the apolipoprotein B editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) that inhibits viral replication by different mechanisms including cytidine deamination in the viral DNA. Sheep contain three APOBEC3 genes that encode 4 proteins (A3Z1, A3Z2, A3Z3, A3Z2Z3) with antiviral characteristics so far unknown. Using monocytes and blood derived macrophages, we have characterized in this study a sharp decreased A3Z1 expression together with a significant increased viral replication. A3Z1 transcripts analysis revealed the presence of splicing variants (A3Z1Tr) that lacked the cytidin-deaminase motif, responsible for the enzymatic activity. Homologous cells (ovine fibroblasts) transfected with A3Z1 showed a reduced production of virus after SRLV infection compared with A3Z1Tr. However, viral obtained sequences were not widely edited. Equivalent splicing variants were also found in human and monkey cells generalizing the presence of A3 truncated spliceoforms in primates. Global restriction exerted by A3Z1 may be

regulated by the expression of truncated spliceoforms lacking citidin-deaminase motif.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. LENTIVIRUS

El género Lentivirus pertenece a la familia Retroviridae caracterizada por retrotranscribir el RNA viral monocatenario a DNA de doble cadena, gracias a la acción de la enzima retrotranscriptasa (RT). Los miembros de este género se distribuyen en dos grupos, atendiendo al tropismo celular y al tipo de enfermedad que provocan. Por un lado se encuentran los lentivirus que se replican tanto en linfocitos como en macrófagos, causando un síndrome de inmunodeficiencia adquirida y una enfermedad que afecta a pulmones, sistema nervioso central (SNC) y tracto gastrointestinal. A este grupo pertenecen los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (HIV-1, HIV-2), el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) y el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV). Los lentivirus del otro grupo infectan macrófagos pero no linfocitos, causando una enfermedad caracterizada por la afección del sistema retículo endotelial, pulmón, SNC, articulaciones y/o glándula mamaria, sin provocar un síndrome de inmunodeficiencia clásico que conlleve una severa depleción linfocitaria en sangre. A este segundo grupo pertenecen el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV).

En Europa, los SRLV son endémicos en el ganado ovino y caprino y su efecto económico ha sido muchas veces subestimado ya que depende de factores relacionados con la susceptibilidad de la raza y del individuo, el sistema de producción, las prácticas ganaderas, el entorno y la edad de reposición [1, 2]. Pero es innegable que causa importantes pérdidas económicas a través del desveje prematuro debido a la reducción de la productividad animal, así como la disminución de la fertilidad, del número de corderos, del peso al nacer y en el engorde y de la calidad de la carne [3, 4]. Provoca también un menor rendimiento en la producción de leche, alrededor del 10%, además de afectar a su calidad ya que contiene menos grasa, lactosa y extracto seco así como un alto porcentaje de células somáticas [2, 5, 6]. Además, los animales enfermos por SRLV no son capaces de montar una respuesta inmune de recuerdo frente a los patógenos [7], con el consiguiente riesgo de contraer

infecciones secundarias que aumentan la mortalidad. Asimismo, la exportación de ganado a otros países se ve también afectada, ya que muchos de ellos exigen certificados de ausencia de virus o de patologías asociadas a la infección por SRLV, valorizando los rebaños certificados libres de SRLV y devaluando los rebaños infectados [8].

Los SRLV engloban al virus Visna-maedi (VMV) y al virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV), que fueron inicialmente descritos de manera diferencial atendiendo a la especie afectada, ovinos y caprinos respectivamente, pero que debido a la proximidad filogenética y a la transmisión natural de los virus entre ovejas y cabras, hoy forman un único grupo genético [9, 10]. El VMV fue el primer virus descrito causante de las llamadas infecciones lentivirales. Fue aislado por Sigurdsson en 1957 [11], durante la epidemia de enfermedades lentas que azotó Islandia en los años cuarenta, tras la importación desde Alemania de veinte ovinos de raza Karakul para la mejora de la producción. La epidemia provocó la pérdida de 150.000 animales afectados y el sacrificio de otros 600.000. La enfermedad causada por CAEV y su etiología retroviral se describieron en Estados Unidos en 1974 por Cork [12] y el virus fue aislado en 1980 [13].

La distribución de los SRLV es universal. En España fueron Badiola y colaboradores los que describieron el virus por primera vez en los años ochenta [14] y su presencia se ha detectado allá donde se ha estudiado. Estudios que comprenden la zona sur de Navarra y La Rioja [15], Euskadi [16] y León [17] revelan prevalencias entre 96 y 100% en rebaños, y entre 40 y 66% en individuos, lo que hace prácticamente imposible encontrar algún rebaño sin individuos seropositivos [18].

Además, los cuadros clínicos observados son diferentes dependiendo de la zona de estudio. Tradicionalmente, las sintomatologías más frecuentes han sido la mamaria y respiratoria [19], aunque en la última década se han descrito formas articulares en Aragón [20] y nerviosas en León [17].

1.1. ESTRUCTURA y GENOMA

El genoma de los lentivirus está protegido por la nucleocápside (NC), que a su vez está rodeada de la cápside (CA) y la matriz proteica (MA). El virión posee una envoltura exterior lipídica procedente de la membrana plasmática celular, donde están embebidas las glicoproteínas de la envoltura viral (Env) formadas por las subunidades transmembrana (TM) y de superficie (SU). En la NC, además del genoma se encuentran proteínas virales asociadas como la retrotranscriptasa (RT), la proteasa (PR) y la integrasa (IN) (Figura 1a).

El genoma está constituido por dos cadenas positivas monocatenarias de RNA idénticas de entre 8 y 9,5 Kb. Básicamente todos los lentivirus presentan una organización genómica similar, donde se encuentran tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) y de tres a seis genes accesorios dependiendo de la especie: *vif*, *vpr-like* y *rev* presentes en SRLV (Figura 1b); y además *vpu*, *tat*, *nef* y *vpx* en HIV. En la forma proviral, el genoma está flanqueado por una región repetida no codificante, denominada *Long Terminal Repeat* (LTR). Pasamos a describir en detalle dichos genes:

- a) ***env* (envelope)**: codifica glicoproteínas que median la unión con el receptor celular. A partir de un precursor único, se sintetiza la proteína que tras ser digerida por proteasas celulares dará lugar a las subunidades transmembrana (TM o gp46) y de superficie (SU o gp135). La proteína Env expresada en la membrana de células infectadas es capaz de unirse a receptores de células sanas provocando la fusión de ambas y permitiendo la propagación de la infección sin necesidad de producir partículas virales completas [21, 22]. Dicha fusión celular origina *in vitro* el efecto citopático característico de las infecciones por SRLV, es decir, la formación de sincitios o células multinucleadas de entre 5 y 30 núcleos. El reconocimiento del receptor celular por parte de la proteína Env la convierte en un factor determinante del tropismo y la patogénesis de los SRLV [23, 24].
- b) ***gag* (group specific antigen)**: codifica una única poliproteína, p55, que tras ser digerida por la proteasa viral produce las proteínas estructurales de la

nucleocápside (NC o p14), cápside (CA o p25) y matriz (MA o p17). La proteína más abundante del virión es la p25, y es relevante desde el punto de vista diagnóstico ya que forma el *core* hidrofóbico del virus induciendo una fuerte respuesta humoral. Además p25 está relativamente conservada entre los genotipos de SRLV, lo que favorece la detección de anticuerpos por reactividad cruzada [25].

- c) **pol (polymerase)**: codifica enzimas que ejercen su actividad en distintos puntos del ciclo viral. La retrotranscriptasa (RT) sintetiza una doble cadena de DNA a partir del RNA viral monocatenario. Además, durante este proceso degrada la hebra de RNA del híbrido RNA/DNA y elimina el cebador tRNA^{Lys-3} a través de la actividad RNAasa H. La proteasa (PR) madura el precursor proteico de Gag en las tres proteínas estructurales; y la integrasa (IN) se encarga de activar los extremos de los transcritos reversos, retirando dos o tres nucleótidos del extremo 3' de cada cadena mediante un proceso que se denomina procesamiento 3', preparando así el DNA viral para la integración. En el núcleo, la integrasa cataliza la reacción de transferencia de cadenas por la que el DNA viral queda ligado covalentemente al DNA cromosómico, forma que se conoce como provirus. Por último, la dUTPasa hidroliza dUTP a dUMP, importante en células que no se dividen, como los macrófagos diana de los SRLV, porque poseen una alta ratio de dUTP:dTTP en el pool de nucleótidos que puede resultar en la incorporación errónea de uracilos en la retrotranscripción [26]. Sin embargo, lentivirus como HIV-1 carecen de dUTPasa y son capaces de originar una infección productiva en macrófagos.
- d) **vif (viral infectivity factor)**: la proteína codificada por este gen es esencial para la replicación de HIV-1 en linfocitos pero no en líneas celulares como HeLa, COS7 o 293T [27, 28]. También se ha observado que Vif es necesaria para la replicación de HIV-2 [29], SIV [30], FIV [31, 32], CAEV [33, 34] y VMV [35] en las células diana naturales tanto *in vivo* como *in vitro*. La proteína Vif evita la incorporación en las partículas virales del factor de restricción celular APOBEC3 (A3) [36] presente en las células no permisivas. Vif se une al factor de

restricción A3 y al complejo E3 ubiquitina ligasa induciendo la poliubiquitinización de A3 y su posterior degradación vía proteasoma [37]. La proteína Vif está constituida por un dominio N-terminal por el que se une a A3, seguido de los dominios HCCH, BC-box y PPLP de unión a las distintas subunidades del complejo E3 ubiquitina ligasa. Recientemente se ha presentado el primer modelo completo de la estructura tridimensional de la proteína Vif y las interacciones mostradas con las proteínas A3G y el complejo E3 están en concordancia con los datos empíricos, lo que podría ayudar en el diseño de nuevas drogas [38].

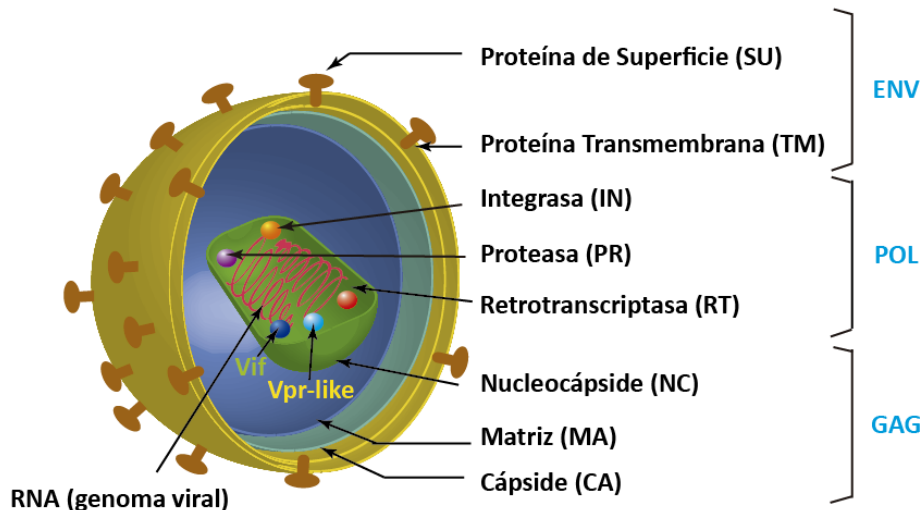
- e) **rev** (*regulator of virion expression*): la proteína Rev es esencial para la replicación viral [39, 40] y está implicada tanto en los procesos de corte y empalme (splicing) que sufren los mRNA virales durante su maduración, como en el transporte y la protección del RNA del núcleo al citoplasma para su traducción. Contiene señales que le permiten entrar al núcleo donde ejerce su acción mediante su unión a RRE (Rev Responsive Element) situado en el gen *env*.
- f) **vpr-like** (*viral protein R*): en un principio se denominó *tat* por analogía a la posición en el genoma comparado con HIV, pero estudios funcionales demuestran mayor compatibilidad con la proteína Vpr [41]. Vpr juega un papel importante en la regulación del transporte del complejo de preintegración (PIC, *Preintegration complex*) al núcleo. Además es necesaria para que el virus se replique en células que no se dividen, como las células de la serie monocito-macrófago, una de las principales dianas del virus. En células con capacidad proliferativa, en cambio, causa un bloqueo del ciclo celular en fase G2 y apoptosis, lo que puede provocar una disfunción inmunitaria.
- g) **LTR** (*Long Terminal Repeat*): están compuestas por las regiones U3, R y U5, y en la forma proviral del virus está presente de manera duplicada en ambos extremos del genoma. No codifica proteína alguna; su función es regular la transcripción viral [42], modulando así las fases latentes y productivas. Por ello, contiene todas las señales requeridas para la expresión génica de eucariotas:

enhancer, promotor, inicio de la transcripción (*capping*), terminador de la transcripción y señal de poliadenilación. La expresión dirigida por las señales contenidas en la LTR se lleva a cabo por las enzimas de la célula hospedadora.

La región U3, situada en el extremo 5' del provirus, contiene la caja TATA, que marca el inicio de la transcripción y los sitios de unión a factores de transcripción necesarios para la regulación, tales como los sitios AP-1 [43], AML [44, 45], AP-4 [46], cajas CAAAT, y los elementos que median una activación inducida por IFN- γ (*gamma-activated sites*; GAS) [47] y por TNF- α (*TNF- α activated site*; TAS) [48]. La región R contiene el sitio CAP y la señal de poliadenilación de los mRNA. Por último, la región U5 es la primera que se retrotranscribe y constituye el extremo 3' del provirus. Se ha observado que los viriones de HIV y MLV presentan transcritos reversos parciales, demostrando que la retrotranscripción comienza antes de que el virus entre en las células diana [49]. Esto podría tener una utilidad práctica en la cuantificación de la producción *in vitro* de vectores retrovirales para su uso en terapia génica, mediante PCR de la región R-U5 de LTR [50].

Numerosos autores han asignado a esta región un papel importante en el tropismo y la patogénesis de SRLV, cuestión en la que se profundizará más adelante. Además, LTR es importante desde el punto de vista del diagnóstico molecular, ya que son secuencias duplicadas en el provirus que presentan regiones conservadas para el diseño de cebadores de PCR, lo que podría aumentar la sensibilidad.

a) Estructura de los Lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV):



b) Genoma de los SRLV:

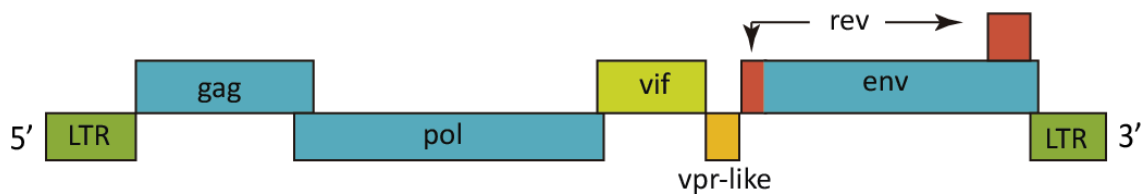


Figura 1: Estructura del virión y genoma de los lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV).

a) Virión de SRLV mostrando sus principales componentes, entre ellos las dos cadenas de RNA de sentido positivo, las proteínas estructurales de GAG (nucleocápside, NC; cápside, CA y matriz, MA), las proteínas POL (proteasa, PR, retrotranscriptasa, RT e integrasa, IN) y las glicoproteínas ENV (superficie, SU y transmembrana, TM) distribuidas en la envoltura lipídica de origen celular. **b)** Genoma de los SRLV (LTRs, gag, pol, vif, vpr-like, rev y env). Se han representado en distintos niveles los marcos de lectura (*reading frames*) que permiten al virus minimizar su longitud para producir todas las proteínas señaladas.

1.2. CICLO VIRAL

El ciclo viral de los lentivirus está constituido por las siguientes fases (Figura 2):

- a) **Entrada en la célula hospedadora:** el ciclo comienza con el reconocimiento del receptor situado en la superficie de la célula permisiva por la glicoproteína de la envoltura del virus (SU o gp135). Tras la unión, la envoltura viral se fusiona con la membrana celular liberando en el interior la cápside vírica. Por el momento no se ha identificado un receptor celular único para la entrada de los SRLV, aunque parecen existir distintos receptores celulares en función del tipo celular ya que se han descrito varios potenciales receptores y correceptores [51-53]. Incluso, algunos autores proponen un uso diferencial del receptor celular según la estirpe de SRLV [54].
- b) **Retrotranscripción e integración:** en el interior de la célula la cápside libera al citoplasma el genoma viral y varias enzimas, incluyendo la RT, IN y PR, que serán transportadas al núcleo. Durante este viaje al núcleo en forma de complejo de pre-integración (PIC) se completará la retrotranscripción o síntesis de la doble cadena de DNA a partir del RNA viral. La retrotranscripción comienza en la región U5, donde se encuentra el sitio de unión del cebador (PBS, *primer binding site*) de tRNA^{Lys-3}, marcando el inicio de la síntesis de la cadena complementaria de DNA de sentido negativo (cDNA(-)). El RNA del híbrido RNA-DNA es degradado por la actividad RNAasa H de la RT y finalmente sintetiza la cadena de sentido positivo (cDNA(+)) desde los denominados tracto de polipurinas situados al final del gen pol (cPPT) e inmediatamente en dirección 5' (*upstream*) de la 3'-LTR (3'PPT), que no son degradados por la actividad RNAasa H de la RT. Esta doble cadena de DNA es transportada al núcleo donde se integra en el genoma celular mediante la acción de la IN, constituyendo el provirus. La RT posee una alta tasa de error, y como los lentivirus carecen de sistemas de corrección de dichos errores, se pueden generar mutaciones en el provirus que a la postre pueden ser beneficiosas para su supervivencia, ya que podría ayudarles, por ejemplo, a evadir el sistema inmune del hospedador. En este punto del ciclo viral es donde ejercen su acción

factores de restricción de la inmunidad innata como TRIM5 α o APOBEC3 que veremos más adelante.

- c) **Transcripción:** el provirus integrado en el DNA del hospedador puede permanecer en estado latente durante un período indeterminado. Diferentes factores ambientales, el estrés de la lactancia o la maduración de monocitos a macrófagos, pueden activar la fase productiva de la infección, ya que desencadenan señales para que la RNA polimerasa II celular reconozca y se una a la caja TATA de la región LTR promotora del virus y comience la transcripción [55, 56]. Es pues la propia maquinaria celular la que transcribe tanto el RNA genómico del virus como los mRNA que codificarán las distintas proteínas virales.

Los monocitos sanguíneos infectados con SRLV muestran niveles muy bajos de transcripción y no expresan proteínas virales. Tras la maduración de estos monocitos a macrófagos tisulares, el virus induce una infección productiva, probablemente debido al aumento de la expresión de factores de transcripción celulares como c-Fos y c-Jun que se unen a los sitios AP-1 y AP-4 del virus activando la transcripción [57, 58]. Así, la transcripción estaría regulada no sólo por los factores disponibles en las células infectadas, sino también por los sitios de unión a dichos factores, el número de éstos y su disposición, presentes en la región LTR del virus. Las estirpes de SRLV presentan LTRs con distintas actividades promotoras que se han relacionado con sus características biológicas y con el tropismo [59].

- d) **Ensamblaje, maduración y liberación:** el precursor proteico codificado por *env* pasa por el retículo endoplasmático rugoso y por el aparato de Golgi, donde se glicosila, para ser transportado a la cara interna de la membrana donde comienza el ensamblaje. Una proteasa celular digiere dicho precursor, dando como resultado las proteínas maduras SU y TM. La maduración del precursor de las proteínas Gag y Pol, sin embargo, se produce gracias a una modificación post transcripcional llevada a cabo por la proteasa viral [60]. Los genes *vif*, *rev* y *vpr-like* se traducen como un único mRNA completamente procesado. Las proteínas

Gag y las codificadas por *pol* se ensamblan rodeando el genoma del virus y se asocian a las glicoproteínas virales ancladas en la membrana plasmática. La nueva partícula viral formada se libera al medio por gemación [55].

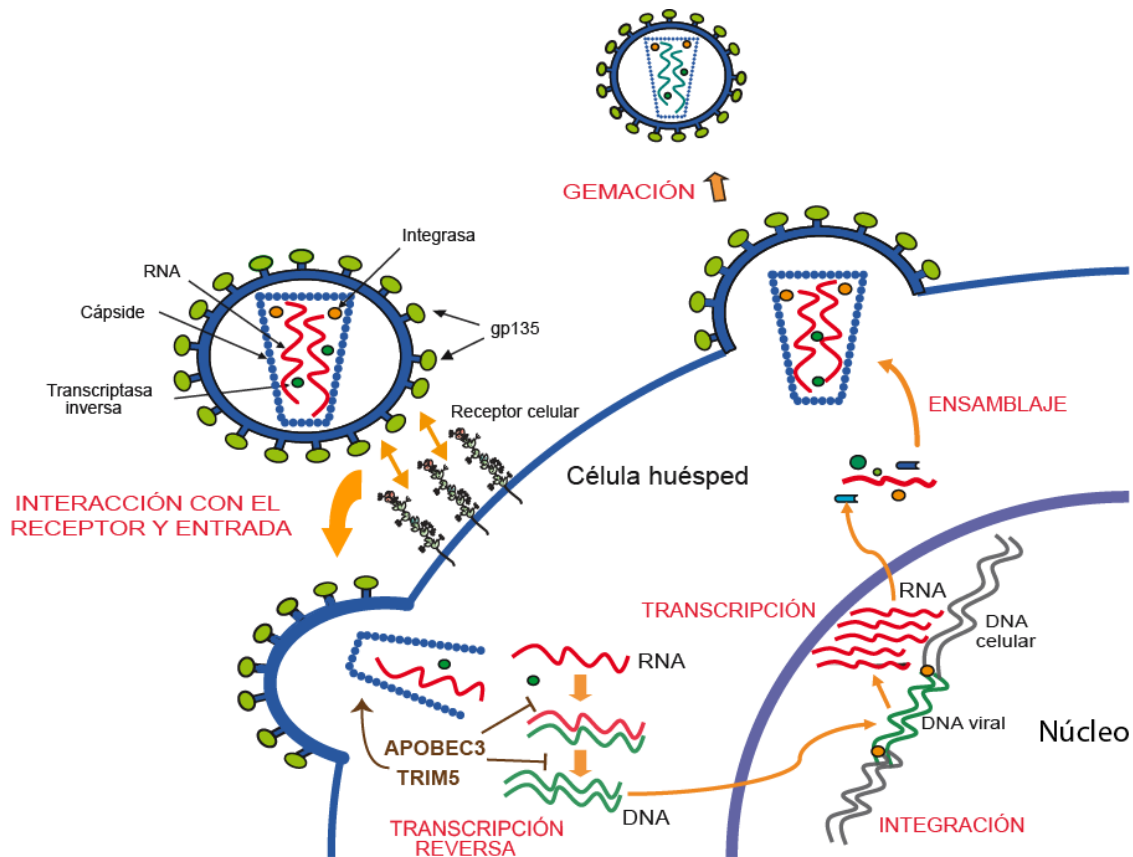


Figura 2: Ciclo viral de los retrovirus. El ciclo viral de los SRLV comienza con la interacción de las glicoproteínas de la envoltura del virus y el receptor celular, produciendo la fusión de la envoltura del virus con la membrana de la célula. Tras la entrada del virus en la célula hospedadora y la consiguiente descapsidación y liberación del material genético en el citoplasma celular, el RNA viral se retrotranscribe a DNA que se transporta al núcleo donde tiene lugar la integración del DNA proviral en el genoma celular. La maquinaria de transcripción y traducción celular sintetiza las proteínas virales que se ensamblan formando los nuevos viriones que se liberan por gemación. Los factores de restricción celulares pueden actuar en distintos niveles, así TRIM5 actúa después de la entrada, uniéndose a la cápside vírica y disminuyendo la cantidad de virus integrado, mientras APOBEC3 actúa en distintos puntos de la retrotranscripción, provocando mutaciones o la degradación del genoma viral.

2. CLASIFICACIÓN

2.1. VARIABILIDAD GENÉTICA

La variabilidad genética de los SRLV es muy alta y se debe a la confluencia de distintos mecanismos [61]. Como se ha señalado anteriormente, la RT posee una **elevada tasa de error**, y la ausencia de sistemas de corrección contribuye a una alta frecuencia de mutaciones puntuales, incluyendo inserciones y deleciones. Se ha estimado que la tasa de mutaciones oscila entre 0,1 y 2 mutaciones por genoma y ciclo replicativo [62]. Otro mecanismo de variabilidad es la **recombinación**, que se da cuando una célula es co-infectada por dos o más virus [63]. En estos casos, durante la retrotranscripción la RT puede saltar de un genoma a otro produciendo virus recombinantes, lo que supone una gran ventaja evolutiva, hecho que se ha demostrado *in vivo* [64]. La diversidad también puede estar causada por la presión selectiva que ejerce el sistema inmune. Así, las proteínas de la familia **APOBEC3** se incorporan en las partículas de nueva formación y durante la retrotranscripción desaminan citosinas produciendo hipermutaciones de G a A en la cadena cDNA(+) que aumentan la variabilidad genética [65, 66]. Por último, la propia célula diana de los SRLV puede contribuir en esta variabilidad genética ya que los macrófagos poseen un **alto ratio de dUTP:dTTP**, lo que proporciona uracilos que pueden ser incorporados mutando el DNA viral [26].

Esta variabilidad ha dado lugar a diferentes genotipos de SRLV capaces de infectar un amplio rango de hospedadores, tales como ovejas, cabras y algunos rumiantes silvestres. Además, muestran un amplio abanico de signos clínicos, como lo demuestran las afecciones neurológicas, artríticas, pulmonares y/o mamarias. Cabe destacar que dicha diversidad cobra especial relevancia en el diseño de tests diagnósticos implementados en programas de control, así como en el desarrollo de vacunas [60].

Pero esta variabilidad no se da por igual en todo el genoma. El tracto de polipurinas, el elemento de respuesta a rev y otras regiones implicadas en el reconocimiento celular (*env*), en la replicación (*pol*) o el empaquetamiento (*gag*) son zonas altamente conservadas entre los lentivirus.

La variabilidad en las secuencias virales que un hospedador puede presentar se conoce como quasi-especies virales. Este concepto fue propuesto por Manfred Eigen [67] y se define como la mezcla de virus que se encuentra en un individuo infectado.

2.2. CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA

Hasta hace una década los SRLV se clasificaban respondiendo a las características biológicas analizadas *in vitro* y la patogenicidad hallada *in vivo* [68]. Pero el estudio de más aislados de campo reveló la dificultad de clasificar las estirpes en estas categorías, por lo que se optó por una clasificación atendiendo a la variabilidad genética antes mencionada. Shah y colaboradores, siguiendo los criterios empleados para HIV [69], propusieron una clasificación de tipo filogenético basándose en dos segmentos largos del genoma de los SRLV (el segmento *gag-pol* de 1,8 kb; y el segmento *pol* de 1.2 kb) [70]. Atendiendo a dicha clasificación, los genotipos virales de SRLV se dividen en cinco grupos (A-E) que difieren entre un 25% y un 37% de su secuencia nucleotídica (Figura 3). Además, los genotipos A, B y E albergan subtipos que difieren entre un 15% y un 27% de su secuencia. Concretamente, los grupos predominantes A (estirpes tipo VMV) y B (estirpes tipo CAEV) se subdividen en quince (A1-A15) y tres (B1-B3) subtipos, respectivamente; mientras que el genotipo E, aislado de cabras italianas, lo hace en dos subtipos (E1-E2). Los genotipos C y D no presentan subtipos. Este grupo D, en el que se engloban estirpes de ovejas de Suiza y España, fue clasificado sólo mediante el estudio del segmento *pol*, aunque análisis de secuencias del gen *gag* lo agrupan junto al genotipo A, sugiriendo que en realidad son el mismo genotipo A con divergencia en la secuencia del gen *pol*.

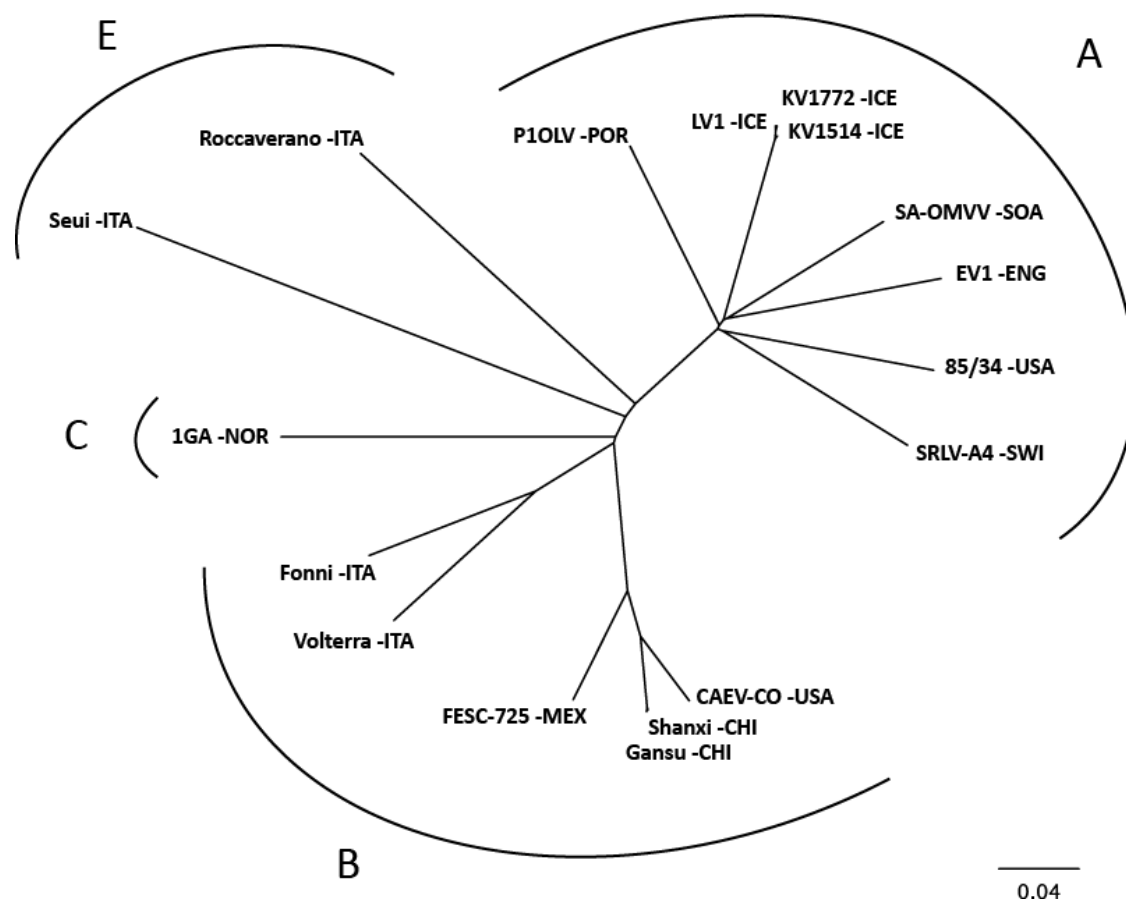


Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas completas de SRLV y asignación de grupo (A-E). Incluye el nombre del aislado y país de origen. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos GenBank (números de acceso subrayados). Abreviaturas de los países: CHI – China (Gansu [AY900630](#) y Shanxi [GU120138](#)); ENG – Inglaterra (EV1 [S51392](#)); ICE – Islandia (KV1514 [M60610](#), LV1 [M10608](#) y KV1772 [L06906](#)); ITA – Italia (Roccaverano [EU293537](#), Seui [GQ381130](#), Fonni [JF502416](#) y Volterra [JF502417](#)); MEX – Méjico (FESC-752 [HM210570](#)); NOR – Noruega (1GA [AF322109](#)); POR – Portugal (P1OLV [AF479638](#)); SOA – Sudáfrica (SA-OMVV [M34193](#)); SWI – Suiza (SRLV-A4 [AY445885](#)); USA – Estados Unidos (CAEV-CO [M33677](#) y 85/34 [AY101611](#), [U64439](#)).

2.3. BIOLOGÍA DEL VIRUS

El estudio de aislados virales permite establecer relaciones entre la secuencia del virus y su comportamiento tanto *in vivo*, patogénesis y tropismo tisular, como *in vitro*, cinética de la infección y tropismo celular. Respecto a las características biológicas analizadas *in vitro*, los aislados pueden dividirse en dos categorías. Por un lado encontramos estirpes que forman sincitios grandes, de más de veinte núcleos, que producen en un periodo corto de tiempo lisis en las células, lo que se materializa en altos títulos en el sobrenadante de los cultivos celulares. Los virus con este comportamiento se conocen como “rápidos” y “altos” (*rapid/high*) [68]. Otros aislados, en cambio, forman sincitios pequeños, de entre tres y seis núcleos, dando lugar a una infección productiva tardía con bajos títulos, a los que se denomina virus “lentos” y “bajos” (*slow/low*) [9]. A continuación se describen los aislados de SRLV de los genotipos y subtipos más relevantes caracterizados hasta la fecha.

Las estirpes pertenecientes al genotipo A, clásicamente definidas como estirpes tipo VMV, suelen manifestar un comportamiento *rapid/high in vitro*. Dentro del subtipo A1 se han caracterizado diferentes aislados. Uno de los más representativos es el aislado británico **EV1** [71], que se ha tomado como estirpe modelo en numerosos laboratorios. Esta estirpe fue aislada de un animal con afección pulmonar y artrítica, y es capaz de replicarse en un amplio rango de tipos celulares en cultivo. Casi al mismo tiempo se analizó la secuencia completa del virus **SA-OMVV**, aislado a partir de una oveja sudafricana con neumonía asociada a Jaagsiekte [72]. La primera estirpe nerviosa completamente caracterizada fue **KV1772**, que se logró tras varios pases intra-cerebrales *in vivo* del aislado **KV1514** [73]. El virus derivado presentaba una neuropatogenicidad aumentada, produciendo síntomas clínicos en el 50% de las ovejas en menos de seis meses y se logró clonar su genoma completo en plásmidos estables. La disponibilidad de este clon molecular ha permitido el estudio de determinantes virales del tropismo celular *in vitro*, concretamente la implicación de la LTR, y de la neurovirulencia *in vivo*, como veremos más adelante. El virus portugués **P1OLV**, aislado de células pulmonares de una oveja infectada de forma natural, es la excepción en este subtipo filogenético A1, ya que presenta un fenotipo

slow/low [59]. La LTR de esta estirpe no posee una repetición presente en virus líticos y el estudio con virus quimera ha revelado una correlación entre el nivel de actividad promotora y la baja replicación viral [42].

En el subtipo A2 encontramos dos estirpes norteamericanas, **USA 85/34** y **USA 84/28**, ambas aisladas a partir de ovinos con neumonía intersticial linfoide pero con un comportamiento muy distinto. La primera es muy patogénica *in vivo* y lítica en cultivo celular, mientras que la segunda apenas produce patología y resulta poco lítica *in vitro*. Estas diferencias biológicas no se correlacionaron con diferencias en las secuencias *env*, ya que presentan una similitud del 97,5% [74]. Por último, dentro de este genotipo A se han agrupado como subtipo A4 estirpes suizas que presentan baja patogenicidad, por ejemplo **SRLV-A4** obtenida de células de leche caprina [70] cuya LTR podría presentar mutaciones puntuales responsables de la baja virulencia [75].

El otro genotipo predominante es el B, donde se agrupan los aislados clásicamente denominados tipo CAEV. Dentro del subtipo B1, el virus más representativo es el **CAEV-Co**, aislado en Estados Unidos a partir de células cerebrales de una cabra con leucoencefalomielitis, y del que se ha obtenido un clon molecular [12, 76]. En este subtipo también encontramos estirpes italianas, como **CAEV-To1/89**, aislada de membrana sinovial de una cabra con artritis, y que a diferencia de CAEV-Co no presenta repetición en LTR que duplique su contenido de sitios GAS y TAS [77, 78]. El subtipo B3 es uno de los últimos que se ha descrito y está configurado por las estirpes italianas **Fonni** y **Volterra**. La primera estirpe fue aislada mediante co-cultivo de macrófagos derivados de sangre periférica (BDM) de una oveja seropositiva con células de plexo coroideo; la segunda a partir de explantes de pulmón de un ovino con afección pulmonar y mamaria [79]. Ambos aislados carecen de sitios GAS y presentan sitios TAS y AP-1 heterogéneos respecto a otras estirpes del genotipo B, hecho que podría influir en su comportamiento tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque aún no se ha estudiado.

El genotipo C está compuesto por estirpes de ovejas y cabras de Noruega. Se ha secuenciado el genoma completo del aislado **1GA**, que fue obtenido a partir del carpo de una cabra con artritis [80].

Por último encontramos el genotipo E, que se divide en los subtipos E1 y E2. La estirpe **Roccaverano**, subtipo E1, fue obtenida mediante cultivo de glándula mamaria de una cabra que no presentaba síntomas clínicos típicos de infección por SRLV [81]. La estirpe **Seui**, subtipo E2, fue aislada por co-cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de una cabra artrítica con células de plexo coroideo [82]. Al comparar la secuencia genómica con la de otros SRLV, se observaron deleciones que se correspondían con la ausencia de la subunidad *dUTPasa* y el gen accesorio *vpr-like*, involucrados en la fidelidad de la RT en células que no se dividen, además de no presentar repetición en LTR. Aunque esta característica era coincidente en los dos subtipos, su comportamiento *in vitro* resultó ser diferente. Ambos aislados se replican de manera eficiente en BDM, aunque sólo el virus Seui se replica en fibroblastos, dando títulos similares a los observados con la estirpe CAEV-To1/89 (subtipo B1) [78]. El análisis amino-acídico de los motivos hipervariables HV1 y HV2 de la proteína ENV mostró que Seui es similar a las estirpes prototípicas de CAEV causantes de artritis, mientras que Roccaverano presenta una mayor variabilidad en esta región de unión al receptor celular. Además, ensayos con virus pseudotipados con la ENV de ambos virus mostraron una tinción paranuclear atípica en macrófagos derivados de monocitos sanguíneos (BDM) en el caso de Roccaverano, sugiriendo un mecanismo de entrada distinto. El análisis de los factores de transcripción presentes en la región U3 mostró que la repetición en tándem del sitio AP4 es suficiente para garantizar la actividad promotora de LTR [83].

Por lo tanto, aunque existen evidencias de una relación entre la secuencia del virus y su comportamiento fenotípico, no siempre es capaz de explicar ciertas propiedades, lo que apunta a la implicación de factores del hospedador que determinan también estas características.

3. TROPISMO

El tropismo de los SRLV depende de las interacciones entre el virus y el hospedador, y éstas pueden darse a distintos niveles:

- A nivel de especie: las estirpes virales infectan ganado ovino, caprino o ambos; además es importante la susceptibilidad de la raza y del individuo.
- A nivel de tejido: dependiendo de los órganos que el virus infectante sea capaz de invadir se manifestarán las distintas formas de la enfermedad (mastitis, artritis, neumonía y/o encefalitis).
- A nivel celular: la restricción de la infección puede producirse en todas las fases del ciclo viral (entrada, integración, transcripción y/o ensamblaje).

3.1. TROPISMO POR ESPECIE

En un principio se pensó que las estirpes tipo CAEV y tipo VMV infectaban de manera restringida cabras y ovejas, respectivamente. Pero numerosos estudios han confirmado infección cruzada superando la barrera de especie. La primera evidencia de esta transgresión fue obtenida mediante infección experimental de ovinos y caprinos con virus tipo CAEV y VMV [84-86].

El análisis de las secuencias de los virus circulantes ha demostrado que esta transmisión cruzada entre ovejas y cabras también se da de forma natural [10, 87, 88]. Así, aunque algunos genotipos se asignaron a una única especie, el aumento de datos revela que el espectro de las especies hospedadoras podría ser mayor en la naturaleza [89].

La transgresión de la barrera de especie sugiere la ausencia o la superación de los sistemas de restricción en el hospedador. La entrada del virus en las células del hospedador supone el reconocimiento del receptor celular por la proteína ENV viral y por lo tanto es susceptible de ser inhibido. Se ha descrito que los SRLV utilizan distintos receptores en células ovinas y caprinas [54] y que el no reconocimiento del receptor es la única barrera que impide que la estirpe EV1 infecte células humanas [90]. En otros estudios, líneas celulares heterólogas son permisivas *in vitro* a virus pseudotipados con la proteína ENV de SRLV, tales como células de pollo, hámster, humano, simio y codorniz, indicando que el receptor celular para los SRLV está ampliamente distribuido entre distintos tipos celulares. Sin embargo, las células derivadas de ovario de hámster chino no son permisivas a la infección [91, 92]. Pero

la permisividad a la entrada del virus no tiene por qué estar asociada a una infección productiva [93] o a una susceptibilidad natural por parte del hospedador, ya que otro tipo de interacciones pueden inhibir la replicación viral tras la entrada. La respuesta inmune innata mediante APOBEC3 o TRIM5 α , que mutan el genoma viral o interactúan con la cápside vírica induciendo su degradación, respectivamente, pueden restringir la infección con especificidad de especie [94, 95]. Por otro lado, el virus ha desarrollado mecanismos para contrarrestar la acción de las proteínas de su hospedador y de otras especies, como la proteína viral Vif que es capaz de neutralizar APOBEC3 de distintas especies [37]. Así, tanto factores virales como celulares podrían también modular el tropismo de especie.

También existe la posibilidad de un bloqueo en la transcripción y/o la síntesis de proteínas virales. Morin y colaboradores concluyen que el bloqueo de la infección por SRLV en bovinos no se debe a la ausencia de receptores virales ni a la producción de anticuerpos neutralizantes [96]. Tras la infección experimental con SRLV, las terneras producen anticuerpos específicos y la infección se establece. Se aislaron virus replicativos tanto a partir de células de sangre como de tejidos sólo durante los primeros 4 meses de infección, tras los que no se detectaron genomas virales. *In vitro*, las células aisladas de las terneras infectadas no mostraron restricción a la infección. Sin embargo, se ha descrito un tipo de restricción en fibroblastos pero no en macrófagos ovinos infectados con estirpes de CAEV. Dicha restricción consiste en el procesamiento erróneo de la proteína Env [97].

Por último, moléculas inducibles por IFN como la teterina serían capaces en ausencia de Vpu, como es el caso de los SRLV, de anclar los viriones emergentes a la membrana y evitar el proceso de gemación [98, 99].

3.2. TROPISMO TISULAR

La existencia de distintos síntomas clínicos de la enfermedad y el hecho de que todos ellos no se manifiesten siempre, sugiere un tropismo específico de órgano por parte del virus. Aunque no existe aún un consenso sobre la región genética concreta responsable del tropismo tisular, LTR y *env* han sido las regiones más

ampliamente estudiadas. La región promotora LTR posee los sitios de unión a factores de transcripción (TBS, *transcriptional binding sites*), es esencial para la replicación viral y podría controlar la especificidad celular [42, 100]. Algunos de estos sitios como AML(vis) o AP-1, parecen necesarios para la biología del virus, ya que permanecen altamente conservados entre los aislados de campo y se mantienen tras pases sucesivos en células en cultivo [101]. La repetición de 53 bp presente en la región U3 de ciertas estirpes nerviosas (visna) incrementa el tropismo hacia células de plexo coroideo [102]; mientras que estirpes aisladas de ovinos con cuadros pulmonares (maedi) no las presentan [103], lo que sugiere que la duplicación de los sitios de unión a factores de transcripción es determinante del tropismo tisular y la patología desarrollada. Además, la delección de 13-14 bp en la región R se ha relacionado con una menor patogenicidad del virus en pulmón [104].

La actividad transcripcional de la región LTR podría estar afectada por la acción de diferentes hormonas. Mediante la unión a los TBS específicos, algunas hormonas esteroideas pueden provocar una variación en la producción y la excreción del virus que se observa a lo largo del ciclo reproductivo de las ovejas. Una alta concentración de esteroides inhibe la expresión dirigida por LTR, aunque concentraciones fisiológicas podrían incluso revertir este efecto hacia una expresión aumentada del VMV [105]. La inhibición/activación de la replicación viral podría estar modulada por los cambios hormonales que se producen durante la gestación, parto y lactancia en los ovinos. La región LTR ha sido ampliamente estudiada como responsable de la cinética viral, ya que se localizan los sitios de unión a los factores de transcripción celulares. Así, se ha descrito que la actividad de la LTR de estirpes con fenotipo *slow/low* es menor que la de estirpes *rapid/high* [42]. Además, algunas estirpes presentan repeticiones que duplican estos sitios de unión, lo que podría ser clave en las diferencias de actividad promotora. Se ha observado que la delección de la caja CAAAT en una de las repeticiones en LTR produce una menor replicación viral en células de plexo coroideo [100], y que la ausencia de repetición del sitio AML(vis) está relacionada con el fenotipo *slow/low* [59]. Sin embargo, no siempre existe una correlación entre las diferencias de secuencia en LTR y el tropismo tisular de las

estirpes [106], lo que hace pensar que otras zonas del genoma viral están implicadas en el tropismo. La secuencia LTR aislada de los distintos órganos de un ovino con enfermedad inflamatoria multisistémica asociada a lentivirus fue única, no hallando diferencias que se pudiesen relacionar con el tropismo tisular [107].

Como hemos mencionado anteriormente, la proteína ENV que reconoce el receptor celular es esencial para la entrada del virus y por ello se ha estudiado como posible responsable del tropismo. Se ha descrito que la estirpe obtenida de cerebro de un ovino con visna, difiere en un 11,7% en la secuencia de la proteína ENV respecto a la del aislado de pulmón de un oveja de la misma raza con maedi [103]. Además, en infecciones persistentes de caprinos, las secuencias de *env* muestran cambios que permiten una evolución rápida [108]. Las distintas quasi-especies podrían invadir distintos órganos y, debido a la presión ejercida por el sistema inmune, quedar aisladas evolucionando en cada uno de ellos de manera diferenciada, lo que se denomina compartimentalización, como se ha demostrado en HIV y FIV [109, 110]. El análisis de la región variable de ENV V4 en ovinos y caprinos infectados, ha demostrado compartimentalización en PBMCs y calostro [24]. En otro estudio, donde se analizan las secuencias de la región TM y V4-V5 de SU de un ovino con visna, también se evidencia una clara compartimentalización en el sistema nervioso central y otros órganos como pulmón y glándula mamaria [23]. Además, las secuencias más próximas a las del ancestro común son las obtenidas a partir de células de lavado broncoalveolar, lo que indicaría una entrada del virus en el organismo por vía aerógena y una posterior distribución a los órganos afectados.

3.3. TROPISMO CELULAR

Las células diana por excelencia de los SRLV *in vivo* son la línea monocito/macrófago y las células dendríticas [111, 112]. El virus es capaz de entrar e integrarse en el genoma de los monocitos, pero no se observa replicación productiva hasta que éstos no maduran a macrófagos [58, 113]. Durante la diferenciación aumenta la expresión de factores de transcripción como c-Fos y c-Jun que, tras unirse a los sitios AP-1 y AP-4 de la región promotora LTR del virus, activan la replicación

dando lugar a una infección productiva [57]. Por otro lado, se ha descrito que la alta expresión de la proteína celular APOBEC3A en monocitos podría estar implicada en la restricción de HIV-1 [114], ya que la expresión disminuye durante la diferenciación a macrófagos. Así, los monocitos circulantes en sangre actuarían de “caballo de Troya” diseminando el virus, y éste se multiplicaría en los tejidos diana tras la maduración a macrófagos [115].

Pero los SRLV son capaces de infectar muchos otros tipos celulares, tales como células de explantes pulmonares [116], del aparato reproductor masculino [117, 118], de la microglia [119-122], de la córnea [123], de bazo [124], células de la granulosa del ovario [125], epiteliales del oviducto [126], endotelio caprino [127, 128], células del tercer párpado [129], médula espinal [130], epitelio tubular del riñón [131], hepatocitos y miocitos [132]. Además, se han establecido líneas celulares inmortalizadas permisivas a la infección, como TIGEF [133], TIGMEC [134] o MOCL [135].

Los macrófagos se utilizan comúnmente para el aislamiento de SRLV porque prácticamente todas las estirpes producen altos títulos en ellas [136]. Pero estas células ya diferenciadas de manera terminal no pueden dividirse, lo que dificulta el manejo en el laboratorio. Las células procedentes de cultivos primarios de plexo coroideo (SCP) [103, 137], fibroblastos de piel ovina (OSF) [97] y de membrana sinovial de cabra (GSM) [42], en cambio, son de fácil manejo, permisivas al virus y en ellas se observa claramente el efecto citopático, por lo que son las más utilizadas *in vitro*. Pero no todas las estirpes producen altos títulos virales en estas células. Como hemos mencionado anteriormente, los aislados se clasifican como *slow/low* o *rapid/high* según su comportamiento *in vitro*, y por el momento se desconoce qué factor es el determinante. El tropismo celular depende en gran medida de la presencia de receptores específicos para los SRLV. Un estudio reciente ha propuesto tres fenotipos celulares dependiendo de la vía de entrada/receptor que utiliza el virus: 1) células que presentan el receptor de la manosa (MR) como principal vía de entrada, sucede en SCP; 2) células que utilizan el MR y al menos otro receptor, visto en macrófagos; y 3) células que no expresan MR y usan otro/s receptor/es, como en

OSF [53]. Además, en animales infectados por SRLV clínicos, la expresión de MR es mayor en los órganos que presentan lesiones más severas, por lo que la presencia de éste se asocia a la evolución de la enfermedad [138].

En resumen, tanto factores genéticos del virus como factores del hospedador están implicados en el tropismo a todos los niveles (hospedador, tejido y célula), y es importante profundizar en el estudio de éstos para conocer las interacciones virus-hospedador.

4. MÉTODOS DE CONTROL

La infección por SRLV en el ganado supone grandes pérdidas económicas, tanto por la reducción en la producción y la calidad como por la restricción en la exportación a otros países. Por ello es importante implementar programas de control que posibiliten la certificación de rebaños libres. En algunos países se han llevado a cabo programas de control durante largos períodos de tiempo, pero muchas veces de manera intermitente y sólo de forma local.

El primer país en tomar medidas para controlar la infección fue Islandia, tras la epidemia sufrida en los años 50, llevando a cabo un reemplazo total de los rebaños que presentaban animales enfermos [139]. Este método, aunque efectivo, es económicamente inviable en países con alta tasa de animales infectados, como es el caso de España. Además, la eliminación de ejemplares de alto valor en términos de producción iría en detrimento de la calidad genética de las razas [140]. El último caso exitoso corresponde al *Norwegian Healthier Goats Program* [141].

La medida de control de los SRLV más extendida se basa en la identificación temprana de animales positivos y el sacrificio selectivo de éstos y su descendencia, utilizando madres seronegativas para la reposición. De esta manera se ha logrado eliminar la infección en rebaños con seroprevalencias cercanas al 30% en un período de 2 a 7 años [142-145]. En rebaños con seroprevalencias mayores se puede optar por la creación de otro rebaño libre de SRLV, separado físicamente del infectado. Los corderos de reposición de este nuevo rebaño son destetados tras el parto y se alimentan con calostro artificial o leche no infectados [140]. En este caso no se

eliminarían animales genéticamente valiosos, pero la necesidad de disponer de dos instalaciones independientes hace que no sea siempre viable. Otras medidas podrían ser la compra anual de animales libres de SRLV para la reposición o la selección genética de animales resistentes [8, 146, 147], aunque habrá que tener en cuenta que esta última no esté reñida con la selección basada en criterios de producción.

A este respecto, regiones como Escocia han implantado programas que abarcan 2600 rebaños acreditados. Por medio del programa *Maedi Visna Accreditation Scheme* los rebaños son testados cada 2 o 3 años para renovar la acreditación, y los ganaderos son asesorados por medio de unas estrictas reglas de bioseguridad para evitar la infección (www.sheepandgoathealth.co.uk). Recientemente, el *Scotland's Rural College* ha dado la voz de alarma porque en los últimos años se han detectado brotes de SRLV en rebaños certificados libres, hallándose en casi todos los casos fallos en el seguimiento de la normativa [148]. Es más, se ha estimado que la infección por SRLV, al no seguir el programa de control, puede reducir la producción de un 20% a un 40%, lo que significaría pérdidas de entre 30.000 a 50.000 libras en una ganadería de gran tamaño [149].

Por otro lado, se han llevado a cabo numerosos estudios para el desarrollo de una vacuna frente a los SRLV, con éxitos parciales. La administración de virus atenuados y la inmunización genética con *env* y/o *gag* han resultado en la estimulación del sistema inmune; pero estas prácticas inducen a su vez respuestas inflamatorias, lo que no ha permitido discernir entre la respuesta a la vacunación y la aparición de lesiones propias de la enfermedad [150-152]. Además, la elevada variabilidad genética y antigénica de los SRLV puede dificultar la inducción de protección frente a virus de distintas zonas geográficas [153]. En esta línea se ha publicado recientemente un estudio de inmunización utilizando la estirpe Roccaveranno, naturalmente atenuada, seguido de la infección del aislado CAEV-Co, altamente patógeno [154]. Los resultados indicaron cierto grado de protección frente al virus heterólogo en ausencia de respuesta proinflamatoria, lo que plantea nuevas posibilidades para el futuro. Pero por el momento no existen ni vacunas ni tratamientos eficaces frente a las infecciones por SRLV, siendo los programas de

control basados en el diagnóstico precoz la única vía para reducir la dispersión del virus.

La selección genética de animales con resistencia natural a la infección por SRLV se ha desarrollado recientemente. La diferencia existente entre rebaños en cuanto a la seroprevalencia y carga proviral observadas sugiere un fuerte componente genético que determina la susceptibilidad de los individuos de ser infectados. Se han asociado polimorfismos en los genes TLR 7, 8 [155], CCR5 [156] y MHC [157] ovinos a la resistencia a SRLV. Un estudio de asociación *genome-wide* (GWAS) con más de 50.000 marcadores realizado con pares de ovinos infectados y no infectados identificó un SNP (E35K) en la proteína transmembrana 154 (TMEM154) asociado significativamente a la resistencia a la infección por VMV [158]. Aunque la función de esta proteína aún sea desconocida, se expresa en células B y monocitos, sugiriendo que podría tener importancia inmunológica. El análisis de 2800 ovejas reveló que aquellas que poseían el alelo E35 tenían un riesgo de infección casi tres veces mayor, convirtiéndolo en un buen candidato como marcador de selección genética. Estudios similares proponen nuevos marcadores que podrían ser incluidos en tests de selección, como DPPA2/DPPA4 o SYTL3 entre otros [159]. La asociación de TMEM154 con la infección podría estar también influenciada por los genotipos de SRLV, ya que se ha observado que distintos subgrupos de virus se han adaptado a infectar ovejas con los genotipos E35 o K35 específicos [160]. Así, tanto los genotipos del hospedador como del virus afectan al riesgo relativo de la infección por SRLV en ovinos. Sin embargo, no está claro que la selección por la resistencia a una enfermedad no aumente la susceptibilidad a otras, o vaya acompañada de descensos en la producción. Además, hay que tener en cuenta que los lentivirus tienen una alta tasa de mutación y es posible que el virus se adapte rápidamente a la selección efectuada [161].

5. DIAGNÓSTICO

Antes de la identificación y aislamiento del virus causante de la enfermedad, el diagnóstico se realizaba mediante observación de los síntomas clínicos y el análisis

anatomo-patológico. Debido a la lenta progresión de la enfermedad, desde que un animal se infecta hasta que muestra síntomas clínicos puede pasar mucho tiempo, incluso años, diseminándose el virus por todo el rebaño sin haberse detectado lesiones. De hecho, los síntomas clínicos no aparecen hasta que aproximadamente el 50% del rebaño es seropositivo a SRLV [148]. Además, como veremos más adelante, los síntomas derivados de la infección por SRLV pueden solaparse con los causados por multitud de patógenos. Por ello se utilizan métodos serológicos y/o moleculares para un diagnóstico preciso y temprano que permita controlar la infección.

5.1. DETECCIÓN INDIRECTA POR SEROLOGÍA

El método más utilizado para el diagnóstico de la infección es la detección indirecta de anticuerpos frente a SRLV. Estos anticuerpos no protegen de la enfermedad, pero son buenos indicadores de la infección. Esta metodología no está exenta de problemas, como los derivados de la alta variabilidad genética y antigénica de las estirpes circulantes en campo, el periodo que tarda el animal entre la infección y la producción de anticuerpos detectables, la intermitencia en la seroconversión durante la vida del animal infectado, todos ellos pudiendo originar falsos negativos y la presencia de anticuerpos maternos que podrían dar lugar a falsos positivos.

La producción de anticuerpos se puede detectar por inmunodifusión en gel de agar (AGID), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoprecipitación (RIPA) y western blot (WB), aunque ninguno de ellos puede considerarse como *gold standard* [162, 163]. Tanto el ensayo RIPA como el WB no se utilizan para el diagnóstico de un alto número de muestras, sino como pruebas confirmatorias [164]. El AGID tiene una alta especificidad, pero su sensibilidad es baja y además su interpretación es a menudo subjetiva [165], por lo que su uso está siendo sustituido por métodos más sensibles y susceptibles de automatización, como es el ELISA, de relativo bajo coste y fácil de interpretar. En rebaños con una alta seroprevalencia, se recomienda el uso del ELISA en vez del AGID como método diagnóstico para la eliminación de la infección, ya que aumenta el éxito del programa de control [166].

Aunque la variabilidad antigénica entre genotipos sea muy alta, se han descrito anticuerpos con reacción cruzada contra antígenos tipo VMV y tipo CAEV [167], permitiendo el control de la infección por SRLV durante años. Sin embargo, el uso de los ELISAs de epitopos derivados exclusivamente de una sola estirpe viral está permitiendo el escape de animales positivos, tal como se demuestra en la infección por los genotipos E [168], B2 [169], A [170] o A4 [171]. A este respecto, existen muy pocos estudios que comparen la sensibilidad y especificidad de los distintos ELISAs comerciales disponibles a nivel internacional y que impliquen tanto muestras ovinas como caprinas [172-174].

Se han desarrollado ELISAs de competición (cELISA CAEV of VMRD Inc. Pullman, WA) que utilizan anticuerpos monoclonales frente a la proteína de la envoltura viral [175], pero es más habitual el uso de ELISAs indirectos. Uno de los primeros descritos se basa en tapizar los pocillos ELISA con virus completo, y se comercializa como AG-CHEKIT (CAEV/MVV kit, IDEXX Switzerland AG, Liebfeld, Bern, Switzerland) [176]. Otros están tapizados con la proteína recombinante GAG p25 y un péptido sintético de la región TM, ambos derivados del genotipo A, Elitest-MVV (HYPHEN Biomed, Neuville-sur-Oise, France) [177] y Pourquoi (ELISA Maedi-Visna/CAEV Serum verification Institut Pourquoi, Montpellier, France). Pero se ha demostrado que los epitopos inmunodominantes de p25 presentan heterogeneidad, lo que afecta a la sensibilidad de los ELISAs basados en una única estirpe [77]. Para solventar este problema, se ha desarrollado un test que se basa en la mezcla de antígenos de la región *gag* y *env* de tres genotipos de SRLV diferentes, A, B y E (IN3 diagnostic. Eradikit® SRLV indirect ELISA for Small Ruminant Lentivirus).

Esta heterogeneidad podría ser favorable a la hora de desarrollar un test con la intención de determinar el serotipo del virus circulante. La proteína SU es muy variable entre los SRLV [178] y péptidos basados en esta región podrían tener un gran potencial para realizar diagnósticos específicos que permitan determinar el genotipo del virus presente en un brote de la enfermedad o en un rebaño concreto. Un estudio de los virus circulantes en Polonia utilizando un ELISA basado en los dominios inmunodominantes de las proteínas MA (p17), CA (p25) y SU, muestra una reacción

antigénica cruzada para los epitopos GAG entre los genotipos A y B, pero no para los epitopos SU, que son específicos de genotipo [179]. Este hecho demuestra, una vez más, la importancia de la correcta elección de los antígenos del test según la finalidad del procedimiento.

La determinación del estatus infeccioso de la cabaña es relevante para poder controlar la infección, pero puede que en algunos casos o áreas concretas el diagnóstico individual resulte económicamente inviable. Por ello se han desarrollado estrategias para poder realizar el diagnóstico en un pool de sueros [180], leche de tanque [181-183] o muestras de semen [174]. El uso de leche individual o leche de tanque en ganaderías de aptitud lechera, además, facilita la toma de muestra al evitar tener que sangrar al animal para la obtención de suero. El uso de muestras de semen podría ser ventajoso en centros de inseminación con machos de alto valor genético [184].

5.2. DETECCIÓN DIRECTA DEL VIRUS

El aislamiento viral es uno de los métodos de detección directa del virus, aunque es lento y laborioso y no se utiliza en un número elevado de muestras. Se trata de cultivar una muestra infectada, generalmente macrófagos derivados de sangre periférica, en co-cultivo con líneas celulares permisivas. La presencia del virus se confirma por la aparición de efecto citopático en el cultivo, consistente en la formación de sincitios, o por la actividad RT en el sobrenadante.

También se utilizan técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistológicas [185]; así como técnicas de hibridación *in situ* o PCR *in situ*, detectándose ácidos nucleicos virales en zonas con lesión compatible con la infección por SRLV [186, 187], pero estas metodologías están restringidas a la investigación o como pruebas confirmatorias, ya que su coste es elevado, no hay gran disponibilidad de reactivos y muchas veces muestran baja sensibilidad [188].

Entre las técnicas moleculares encontramos el ensayo de movilidad heteroduplex (HMA), útil para la caracterización genotípica de estirpes [189], la técnica de amplificación isotérmica (LAMP) [190] y la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), que indiscutiblemente es la técnica más usada. Son muchos los factores que pueden influir en la detección del virus por PCR, tales como el tipo y la calidad de la muestra de partida, la carga viral en sangre que varía durante la infección, la variabilidad de las secuencias entre estirpes y la zona del genoma viral que se escoja para diseñar los cebadores [171].

Mediante PCR se ha detectado el genoma proviral en muestras de leche o secreciones mamarias [191-193], semen [194], líquido sinovial [195], distintos tejidos [192, 193, 196], PBMCs [191, 195, 197, 198] y leucocitos derivados de sangre (PBL) [199, 200], siendo estas dos últimas fuentes las más utilizadas para el diagnóstico de la infección. Hay que tener en cuenta que en los PBMCs hay sólo un monocito infectado entre 10^4 - 10^5 células, por lo que la PCR diseñada debe ser muy sensible.

Una de las estrategias para aumentar la sensibilidad es el uso de PCRs anidadas o semi-anidadas que implican dos o más rondas de amplificación [201, 202]. Además, se puede combinar con el uso de cebadores degenerados, que permitiría solventar el problema de la heterogeneidad en las secuencias genómicas de los SRLV. Un estudio reciente incluyendo muestras tanto ovinas como caprinas demuestra que el aumento en la degeneración de los cebadores mejora la detección de la infección mediante PCR semi-anidada [203]. Las zonas conservadas del genoma son apropiadas para el diseño de los cebadores cuando el propósito es el diagnóstico, y zonas variables son más adecuadas para estudios filogenéticos. En la bibliografía podemos encontrar cebadores diseñados a lo largo de todo el genoma viral, incluyendo los genes *gag*, *pol* y *env*, o las regiones LTR, mostrando diferencias en sensibilidad y especificidad [194, 204]. La sensibilidad de la PCR es mayor si se amplifica la región *gag* en comparación con la región *pol* [205], aunque podría verse superada por el uso de la región LTR como diana [193, 199, 206], ya que la secuencia está duplicada en la forma proviral insertada en el genoma del hospedador.

Además de la PCR convencional también se ha utilizado, aunque en menor medida, la PCR en tiempo real (RT-PCR) para la detección y cuantificación de SRLV [207-209]. La RT-PCR posibilita la cuantificación de la carga viral [210, 211] y el uso de sondas Taqman en estas reacciones aumenta la especificidad. Es tal la especificidad,

que se han desarrollado y validado dos ensayos RT-PCR que permitirían la detección diferencial de los genotipos A y B [212]. Otro ensayo diseñado en el gen *env* detecta animales positivos mucho antes de la seroconversión en infecciones experimentales con una estirpe del genotipo B, además de detectar animales con clínica natural por CAEV, aunque no es capaz de detectar la infección por VMV (genotipo A) [213]. Hay que tener presente que la variabilidad en las secuencias de campo podría disminuir la sensibilidad de esta técnica.

La secuenciación de los amplicones obtenidos en las PCRs aporta información sobre la diversidad genética de los virus circulantes y podría ser de gran utilidad para el diseño de PCRs de carácter local que ayuden a mejorar el diagnóstico [153]. Además, la PCR se puede acompañar de otras metodologías que permitan distinguir entre estirpes sin la necesidad de secuenciar, como el análisis de los amplicones con enzimas de restricción [204], HMA [214] o la utilización de RT-PCR multiplex [171].

Numerosos estudios apuntan a que, por regla general, el diagnóstico serológico, sobre todo mediante ELISA, es más sensible que el diagnóstico por PCR [215], aunque la PCR puede detectar animales infectados que aún no hayan seroconvertido [198]. Por ello, la complementación de ensayos serológicos con técnicas PCR sería óptima para el diagnóstico y posterior control de la infección por SRLV [216, 217].

6. PATOGÉNESIS Y FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

Actualmente está bien establecido que la transmisión de los SRLV se produce principalmente mediante el contacto con aerosoles de secreciones respiratorias procedentes de animales infectados (vía horizontal) y/o por la ingestión de leche o calostro infectado (vía lactogénica). El virus, en forma libre o por medio de células infectadas, entra en el hospedador a través del tracto respiratorio, la conjuntiva del animal o los capilares fenestrados del intestino en corderos [218]. Estudios de otras posibles formas de transmisión, tales como la intrauterina [219] y la sexual [184, 220],

han descartado éstas como vías de entrada importantes al no mostrar evidencias claras.

Una vez dentro del hospedador, el virus infecta macrófagos y células dendríticas de las mucosas, que migrarán a través del sistema linfático aferente hasta los ganglios. Allí transmiten la infección a los monocitos/macrófagos, que se diseminarán por la linfa eferente y el conducto torácico, llegando al torrente sanguíneo e instaurando una infección sistémica. Los monocitos que se hallan en la sangre periférica se infectan pero no de una manera productiva, por lo que el virus permanece invisible al sistema inmune y es capaz de distribuirse por los órganos diana a modo de “Caballo de Troya” [115]. En los tejidos, los monocitos maduran a macrófagos activando la replicación del virus [57, 58][57, 58], que a su vez activa la respuesta inmune frente a los antígenos virales. Se producirá una infiltración de células linfocitarias hacia el tejido y se reclutarán nuevos monocitos, tanto infectados en estado de latencia como no infectados susceptibles de infectarse, estableciéndose los procesos inflamatorios característicos de la infección por SRLV. Se ha propuesto que, a través de los monocitos, el virus podría alcanzar la médula ósea e infectar células madre mieloides o células del estroma, lo que resultaría en la instauración de la infección durante toda la vida del animal, ya que la médula ósea actuaría de reservorio y sería una fuente continua de células infectadas [130].

Tras el primer contacto del virus con el hospedador, se produce una breve viremia inicial que conducirá a la seroconversión del animal por la síntesis de anticuerpos frente a los antígenos virales [221]. Estos anticuerpos pueden neutralizar el virus en un principio, pero no son capaces de eliminar totalmente la infección ya que el virus se inserta en el genoma celular entrando en un período de latencia que puede durar semanas, meses o incluso años. Después de este período, y provocado por distintos posibles factores, el virus volverá a replicarse induciendo una reacción inmunitaria acompañada de la infiltración/acumulación de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en el tejido infectado, causando hiperplasia folicular, inflamación no supurativa y fibrosis [222]. La afección de los tejidos provoca la aparición de los cuadros sintomáticos típicos conducentes a la muerte del animal [223]. Además,

aparece un tipo de inmunodeficiencia asociada a las manifestaciones clínicas de la infección, que se caracteriza por la incapacidad del animal de producir respuestas de recuerdo frente a antígenos de SRLV u otros. Este fallo del sistema inmune se relaciona con la disminución de los niveles de moléculas coestimuladoras B7 necesarias para la correcta presentación de los antígenos, la anergia de los linfocitos T y los bajos niveles de producción de interferón gamma [7, 224, 225]. Es por esto que las infecciones clínicas por SRLV representan un peligro añadido para el animal, ya que no es capaz de luchar contra otros microorganismos patógenos, a pesar de que el animal continúe presentando elevados niveles de IgG1 frente a antígenos virales a lo largo de su vida [226].

Los tejidos diana de los SRLV son el pulmón, el sistema nervioso central (CNS), las articulaciones y la glándula mamaria, provocando una enfermedad inflamatoria multisistémica que cursa con neumonía, encefalitis, artritis y/o mastitis. Por lo general, uno de los órganos se ve mayormente afectado, aunque varios tejidos pueden mostrar lesión con severidad variable. El tipo y el grado del cuadro clínico que se desarrolla están determinados por distintos factores: por un lado, la base genética de la especie, raza o animal hospedador que condiciona tanto la respuesta inmune innata como adquirida y por otro, las características genéticas y biológicas de la estirpe infectante que condicionarán el tropismo y la virulencia. Así, algunas estirpes clásicamente clasificadas como tipo VMV (genotipo A) son más neurovirulentas, mientras que las tipo CAEV (genotipo B) han sido aisladas con mayor frecuencia de animales con cuadros artríticos. Las formas mamaria y articular no suelen, por sí solas, causar caquexia y muerte del animal, aunque provocan un reemplazo prematuro debido a un descenso en la producción de leche y dificultades locomotoras. Las formas respiratoria y neurológica, en cambio, sí que conducen a un estado de caquexia y muerte, ya que provocan disfunción respiratoria o alteración general del sistema nervioso. Las lesiones producidas por la infección se pueden calificar como inmunomediadas, ya que la patología deriva principalmente de la respuesta inmune crónica del hospedador frente a los antígenos virales [226].

Las formas pulmonar y mamaria son las más extendidas en el territorio español, aunque profundizaremos en las formas artrítica y neurológica ya que en la última década se han descrito dos brotes con esta clínica en ovinos de Aragón y Castilla y León, respectivamente, que están produciendo gran alarma entre los ganaderos afectados.

6.1. FORMA PULMONAR

El síntoma más característico de la afectación pulmonar por SRLV es la disnea o dificultad para respirar. Precisamente es ese el significado de “maedi”, término islandés con el que se denominó a esta enfermedad detectada por primera vez en Islandia en los años 30 y que estaba acompañada de un aumento en la frecuencia respiratoria, respiración abdominal y jadeo [227]. Este síndrome tiene gran relevancia con respecto a la prevalencia y pérdidas económicas ocasionadas en ovinos, aunque parece no ser tan frecuente en ganado caprino. Los síntomas clínicos están producidos por una neumonía intersticial, que aumenta el grosor de los septos alveolares y reduce progresivamente la capacidad de intercambio gaseoso de los pulmones afectados [228]. Como consecuencia se produce una pérdida progresiva de peso, que lleva a la caquexia y termina con la muerte del animal por insuficiencia respiratoria.

Macroscópicamente los pulmones muestran una decoloración gris y un notable incremento de tamaño y peso, acompañado de una severa linfadenitis con tumefacción de los nódulos linfáticos. También suele evidenciarse punteado gris en la superficie pleural pulmonar. A nivel microscópico, las lesiones se caracterizan por una acumulación linfocitaria, con predominio de los linfocitos T CD8+ [229], unido a hiperplasia del músculo liso y fibrosis de los pulmones. En los ganglios mediastínicos y traqueobronquiales se observa una hiperplasia de las áreas corticales y paracorticales.

6.2. FORMA MAMARIA

La forma mamaria fue descrita por primera vez en 1985 tanto en ovejas como en cabras, y ya entonces se consideró una vía de transmisión eficiente en los neonatos [230]. La sintomatología observada es una mastitis indurativa difusa, bilateral y crónica que muchas veces está asociada a la forma pulmonar [223, 231]. Afecta a animales adultos, de entre 3 y 5 años y suele pasar desapercibida ya que en estos animales es esperable cierto endurecimiento de las mamas y no cursa con dolor [1].

A nivel macroscópico se observa un aumento del tamaño y consistencia de la glándula mamaria y de los ganglios linfáticos supramamarios. Microscópicamente, el síndrome provoca una mastitis intersticial crónica con hiperplasia de folículos linfoides y una intensa fibrosis que modifica la estructura normal de los acinos glandulares. La replicación del virus en macrófagos y células epiteliales de los acinos [232] produce una reacción inflamatoria intensa que afecta al parénquima glandular, septo interlobular y conductos galactóforos, cuya luz se obstruye parcial o totalmente provocando atrofia del tejido disminuyendo la producción de leche [5].

6.3. FORMA ARTICULAR

La forma articular de la enfermedad se describió en los años 80 en Estados Unidos tanto en ovejas como en cabras [233, 234], aunque la incidencia es más elevada y tiene mayor importancia en ganado caprino. También encontramos referencias que la describen en Europa, pero de una manera bastante aislada [235]. Esta manifestación clínica se caracteriza por una hipertrofia de la articulación, artritis proliferativa crónica y sinovitis que provoca cojera y marcha dificultosa en el animal.

Macroscópicamente se observa engrosamiento en la articulación carpal, aunque también puede estar afectada la articulación tarsal, con congestión de las membranas sinoviales y fibrosis de la cápsula articular, por lo que el cociente carpo/metacarpo está aumentado (>2.0) [236]. En estadios avanzados puede incluso producirse erosión y destrucción del cartílago y hueso. A nivel microscópico se observa una sinovitis proliferativa crónica, apreciándose hiperplasia, angiogénesis,

infiltración de células inflamatorias y necrosis de la membrana sinovial. En el líquido sinovial se detecta un aumento de macrófagos, células plasmáticas y linfocitos T, predominantemente CD8+, mientras que en los infiltrados perivascuales se acumulan células B [237], responsables del incremento del título de anticuerpos frente a gp135, que además puede corresponderse directamente con la severidad de la artritis [238].

El ganado en España no manifiesta aparentemente esta forma clínica, aunque en los últimos años se ha detectado un brote artrítico en Aragón en ganaderías ovinas con una alta seroprevalencia a SRLV (>80%) [20] que aumenta en un 1-2% anual en cada rebaño. El hecho de que en estas ganaderías coexistan ovinos y caprinos, y que las cabras muestren positividad a SRLV además de lesiones similares, sugiere una transmisión interespecie del virus. La afección clínico-patológica y las lesiones tanto macroscópicas como microscópicas observadas en este brote son similares a las descritas previamente, aunque en la mayoría de los casos las lesiones son moderadas y no provocan problemas locomotores. El carácter leve de las lesiones y la confusión con infecciones por *Mycoplasma* podría ser la explicación de la baja incidencia de la forma artrítica en España, incidencia que podría estar subestimada. Alrededor del 54% de los animales analizados mostraron lesiones microscópicas compatibles con la forma pulmonar y el 77% con la forma mamaria, lo que indicaría una infección policlonal mediante contacto con distintas estirpes, o alternativamente la micro-evolución de una única estirpe en los distintos tejidos [23, 24]. El estudio genético y biológico de aislados de este brote artrítico podría dar luz a muchos de los interrogantes planteados, además de aportar información de las estirpes circulantes en España, que podría ser útil para mejorar los métodos diagnósticos que se utilizan hasta el momento.

6.4. FORMA NERVIOSA

La forma nerviosa de la infección comienza con la entrada de monocitos al CNS o la infección de macrófagos perivascuales. El virus provocaría una alteración de la barrera hematoencefálica produciendo cambios en la permeabilidad vascular e

incrementando la migración de células inflamatorias [239, 240]. Tras la invasión viral, se produce la lesión crónica inflamatoria no purulenta del neuroparénquima, provocando la sintomatología nerviosa, que incluye debilidad del tercio posterior, descoordinación motora o ataxia y parálisis que normalmente conduce al postrado decúbito, aunque el animal permanece alerta y responde a estímulos externos. Cuando la enfermedad avanza, el animal entra en un estado comatoso que culminará con la muerte [17, 241].

Esta forma clínica se describió por primera vez en Islandia tras la epidemia de VMV que asoló la isla en los años 40 [242], y que denominaron “visna”, desgaste en islandés. Desde entonces se han descrito casos esporádicos en otros países, como Estados Unidos, Holanda o Gran Bretaña, generalmente acompañados de la forma respiratoria [186, 243-245]. Sin embargo, en los últimos años se han detectado numerosos casos de la forma nerviosa en ovinos de la raza Assaf del nordeste de España. Entre los años 1997 y 2004 se diagnosticó la enfermedad en el 4,4% de las ovejas examinadas en Castilla y León, de las que un 40% evidenciaban síntomas. Los animales afectados mostraron meningoencefalitis no supurativa, y alrededor del 50% tenían 2 años o menos, convirtiéndose además en la causa principal de pérdida de animales adultos [17]. Se han detectado casos en los que únicamente la médula espinal se ve afectada, hecho que ocurre en muy pocas ocasiones [246]. Se ha diagnosticado incluso en animales muy jóvenes en distintas ganaderías, en corderos de entre 4 y 6 meses, exhibiendo afección principalmente en los pedúnculos del cerebelo [247]. Algunos estudios preliminares indican que la distribución de este brote podría no estar restringida geográficamente [248] apuntando a la importancia de identificar animales infectados por la estirpe circulante en dicho brote.

Macroscópicamente no son frecuentes las lesiones en el cerebro o la médula espinal, aunque ocasionalmente se ha identificado daño tisular severo con licuefacción de zonas de la sustancia blanca del encéfalo y malacia en zonas de la médula espinal [1, 17, 242]. A nivel histológico, se observa una meningoencefalitis no purulenta crónica, generalmente acompañada de desmielinización. Se han descrito tres patrones lesionales distintos, según la localización del daño [246]: el patrón

vascular, en el cual las células mononucleares se organizan en forma de manguitos perivasculares, el **infiltrativo**, en el que se produce además infiltración no purulenta del neuroparénquima y el **malácico**, cuya principal característica es la desmielinización. Más de un patrón de este tipo puede coexistir en un mismo animal [249].

Recientemente se ha descrito una clasificación de las lesiones nerviosas atendiendo a la naturaleza de las poblaciones celulares presentes en los infiltrados inflamatorios, a la localización y al grado del daño. Así, existen lesiones linfocíticas o histiocíticas con predominio de linfocitos o macrófagos, respectivamente [250]. Dentro del **patrón linfocítico** se distinguen dos tipos, el **A**, en el que la lesión se localiza en plexo coroideo y meninges, apenas hay afectación del neuroparénquima y hay predominio de linfocitos T; y el **B**, en el que la región más afectada es el neuroparénquima, apenas hay lesión en el plexo coroideo y meninges y predominan los linfocitos T CD8+. El **patrón histiocítico** se asocia con lesiones más severas y predominio de macrófagos. También se distinguen en este patrón dos tipos, el **A** que presenta afectación principal en plexo coroideo y meninges y acumulación además de linfocitos B; y el **B**, que se corresponde con las lesiones más severas, abundantes macrófagos con citoplasmas espumosos, extensas zonas de malacia y desmielinización del neuroparénquima. Estos patrones lesionales pueden estar relacionados con diferentes estadios o diferentes mecanismos de resistencia a la enfermedad, dándose un solo patrón para cada individuo. Las lesiones linfocíticas aparecen en los estadios iniciales o latentes de la enfermedad, en los cuales el animal puede presentar cierto tipo de resistencia natural a la infección. Los patrones histiocíticos son más severos y pueden deberse a una pobre respuesta inmune por parte del hospedador y/o a una mayor virulencia de la estirpe viral [240].

El análisis de los brotes nerviosos con un alto número de casos clínicos, como el descrito en Islandia, el observado en algún rebaño de Gran Bretaña o el descrito en España, podría darnos pistas de los determinantes de la enfermedad nerviosa. Por un lado, en todos los casos la prevalencia de la infección era muy alta, entre un 60% y un 90%. Además, podría considerarse una predisposición genética del hospedador o la

raza, ya que la forma nerviosa se ha manifestado sobre todo en razas de aptitud lechera. El manejo intensivo del ganado podría ser también un determinante, que conllevaría una alta tasa de infecciones y reinfecciones. Por último, la propia naturaleza de la estirpe que está provocando la enfermedad podría ser decisiva. A este respecto, en la bibliografía encontramos numerosos estudios de aislados del brote nervioso acaecido en Islandia, habiéndose caracterizado de manera exhaustiva. Por un lado, dos estirpes con menos de un 1% de diferencia en su secuencia genómica, difieren en la inducción de enfermedad siendo una altamente patogénica y la otra baja [251]. Por otro lado, determinantes en el LTR parecen determinar la capacidad de las estirpes para colonizar el SNC [102]. El aislamiento, la caracterización y comparación de aislados del brote de España con los del brote islandés podrían darnos mucha información a este respecto y dilucidar si la genética viral es un determinante de la forma clínica.

7. RESPUESTA INMUNE INNATA

Durante la evolución, los mamíferos han desarrollado mecanismos para protegerse de las infecciones virales. El sistema inmune adaptativo es fundamentalmente el responsable de conferir protección frente a los virus, pero su principal escollo es que se activa como respuesta a un estímulo, frecuentemente el del propio virus que ya se está replicando. Además de la efectiva respuesta adaptativa, existen otras proteínas con actividad antiviral en las células con independencia de la estimulación por parte del patógeno, que pueden ejercer un papel importante en el control de la susceptibilidad del individuo a la enfermedad. Estas proteínas forman parte de la denominada inmunidad intrínseca antiviral, definida como una forma de inmunidad innata que directamente restringe la replicación y el ensamblaje viral [22, 252, 253]. Los factores de restricción forman parte de esta defensa celular intrínseca, y son proteínas antivirales expresadas de manera constitutiva en ciertos tipos celulares, o inducida por interferón en otros, que inhiben algún paso del ciclo viral. Así, su actividad está presente en la célula sin

requerir señalización provocada por el virus u otro tipo de comunicación intracelular, aunque su expresión puede verse aumentada tras la infección viral.

Los factores de restricción reconocen componentes genéricos virales conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) mediante los receptores de reconocimiento de patrones (Pattern-Recognition Receptors, PRRs) [254]. Los PRRs inhiben la infección viral indirectamente induciendo la producción de interferón y respuestas proinflamatorias, mientras que los factores de restricción bloquean la replicación viral de forma directa [22] (Figura 4).

Los múltiples contactos con los factores de restricción durante la evolución han dado lugar a la aparición de contramedidas virales, codificadas por los genes accesorios, que excluyen dichos factores recuperando así la infectividad. Los virus defectivos en este antagonista serán capaces de replicarse sólo en los tipos celulares que no expresen estos factores de restricción. Así, las líneas celulares que permiten la replicación viral no expresan el factor de restricción y son denominadas *permisivas*, mientras que las que no la permiten se denominan *no permisivas* y lo expresan. Estas líneas celulares han sido utilizadas para identificar por un lado factores de restricción celulares y, por otro, los correspondientes antagonistas virales. Dado que entre el factor de restricción y su antagonista se da una interacción directa proteína-proteína, éstos muestran una tasa de evolución inusual en la secuencia aminoacídica, mostrando codones con una alta selección positiva. Y por último, la expresión de los factores de restricción está íntimamente ligada a la respuesta inmune innata, concretamente está fuertemente inducida por interferón de tipo I. En el caso de los lentivirus, los factores de restricción más estudiados son TRIM5, teterina y APOBEC3.

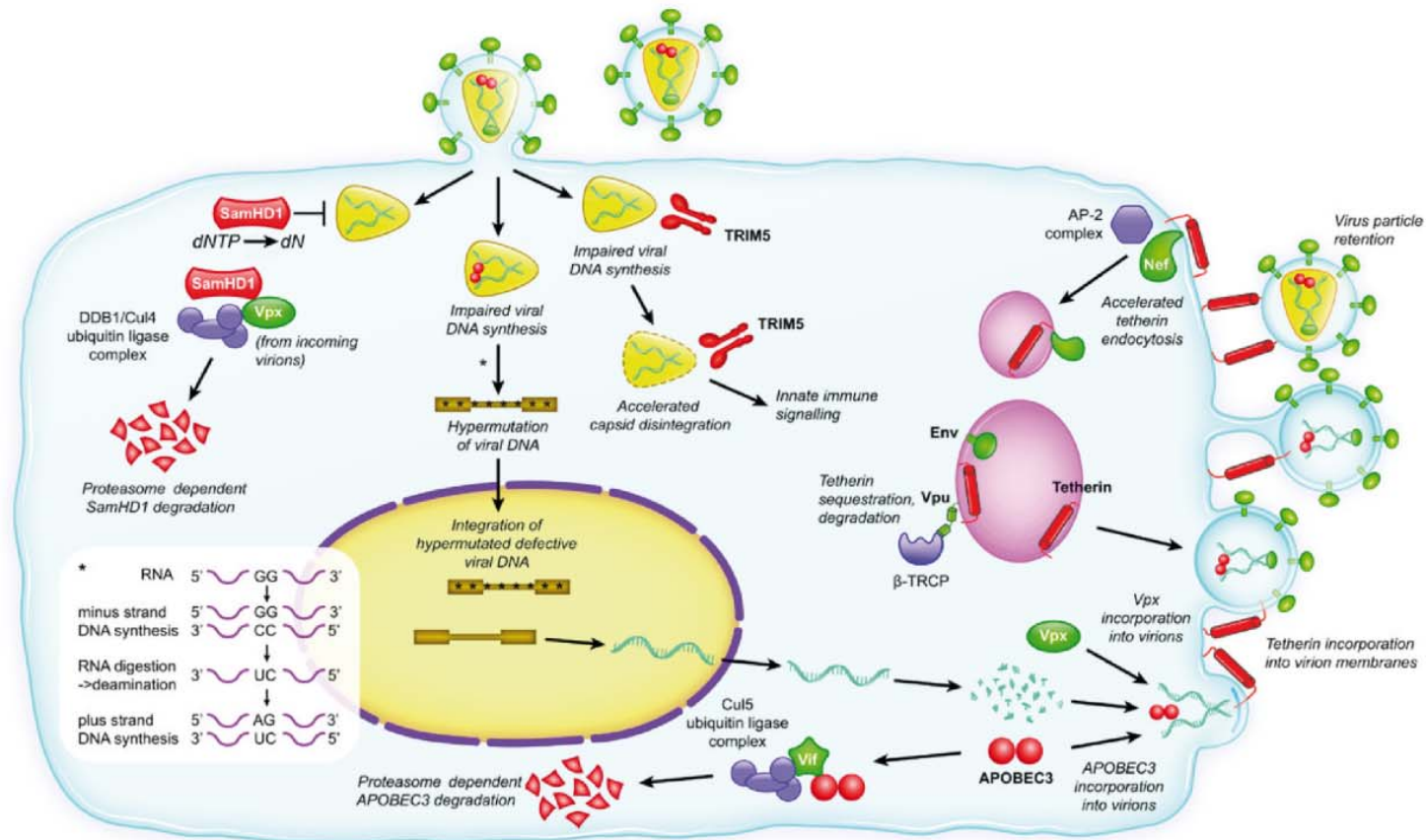


Figura 4: Factores de restricción frente a los retrovirus (APOBEC3, TRIM5, Teterina y SAMHD1) e interacciones con proteínas virales accesorias (Vpu, Vif, Vpx, Nef) de defensa viral frente a los factores celulares. Cada factor retroviral tiene como diana un paso específico del ciclo viral e inhibe la replicación viral mediante mecanismos diferentes. El proceso de hipermutación mediado por APOBEC3 se indica en el panel. Extraído de [253].

7.1. TRIM5 (tripartite motif-containing 5)

Inicialmente se describió en humanos la proteína Restriction factor-1 (Ref-1) y en primates la proteína Lentivirus susceptibility factor-1 (Lv1) como factores inhibitorios de la infección retroviral [255] [256]. Ambas restringían la infección por retrovirus (N-MLV) pero también por lentivirus (HIV-1, HIV-2, SIVmac y EIAV) [257], bloqueando la infección antes de la retrotranscripción [252, 258]. El bloqueo de esta infección se podía evitar manipulando la secuencia de la cápside vírica, y era saturable, dominante e independiente de la ruta de entrada. En 2004 se descubrió TRIM5 α como parte de la familia de moléculas TRIM en el macaco rhesus [259] y se demostró que Ref1 y Lv1 estaban codificadas por variantes del gen TRIM5 α específicas de especie [260, 261]. Además de en humanos y primates, se ha descrito también actividad antiviral mediada por TRIM5 α en ganado bovino, en conejos, en liebres y en ovinos [95, 262-264], lo que sugiere que estos genes proceden de una secuencia ancestral con actividad antiviral y que esta defensa antiviral está extendida en todos los mamíferos. Generalmente TRIM5 α ha sido caracterizado como factor de restricción frente a virus heterólogos, responsable de la barrera entre especies, mostrando poca o nula actividad frente a los retrovirus que infectan la propia especie. Así, TRIM5 de humanos carece de actividad frente a HIV-1 pero restringe activamente la replicación de EIAV y MLV-N. Las diferencias en la especificidad de TRIM5 α así como en los niveles de expresión pueden modificar la permisividad a la infección, como en el caso de TRIM5 α ovino frente al virus VMV [95, 265, 266].

Aunque las proteínas de la familia TRIM presentan diferentes funciones, poseen una estructura y organización de dominios muy similar, con elementos comunes como el motivo tripartito RBCC en el extremo amino terminal, que consta de un dominio RING con actividad E3 ubiquitina ligasa, uno o dos dominios B-Box y una región Coiled-coil [267]. La isoforma TRIM5 α , activa frente a retrovirus, contiene en el extremo carboxilo terminal un dominio B30.2, también llamado PRYSPRY, que se une a la cápside retroviral [268]. PRYSPRY es el mayor determinante de la especificidad de la diana viral o del espectro de retrovirus que se restringen por una variante de TRIM5 α en particular [269].

Aunque no se conoce con exactitud la forma en que TRIM5 α restringe la infección por retrovirus, se estima que el hito más importante es el reconocimiento y la unión de la cápside vírica en una etapa temprana del ciclo viral tras la entrada en la célula. Los dímeros de TRIM5, a su vez, multimerizan en hexámeros, constituyendo una red que es complementaria a la cápside vírica. En la formación de los hexámeros están implicados los dominios CC, B-Box2 y la región Linker 2 (L2) situada entre CC y PRYSPRY [270]. Sin embargo, el dominio que reconoce la cápside vírica y se une a ella es PRYSPRY [271, 272].

El mecanismo de acción más aceptado en la comunidad científica tiene lugar en dos fases. La primera de ellas es suficiente para la inhibición de la infección viral y consiste en la unión de TRIM5 α a la cápside vírica. En la segunda fase TRIM5 α induce una desencapsidación abortiva del virus unido, por una vía dependiente del proteasoma, probablemente por autoubiquitinación mediada por el dominio RING.

TRIM5 α también se ha visto implicado en la restricción de la infección de retrovirus en una etapa tardía (conocida como *late restriction*) en la que TRIM5 evita la producción de viriones en la célula infectada de una forma independiente del dominio PRYSPRY, identificando los dominios RBCC como responsables de la especificidad en este tipo de restricción [273]. La restricción en esta etapa implica una interacción entre TRIM5 α y los componentes virales durante el ensamblaje de los nuevos viriones. El papel relativo que juegan las dos etapas, temprana y tardía, en la restricción frente a los distintos virus depende de la especie de mamífero de la que procede TRIM5 α y del virus al que éste restringe [274].

Aunque su mecanismo de acción sea desconocido todavía, está claro que TRIM5 α representa un arma del sistema inmune para bloquear la infección por retrovirus. Su expresión es constitutiva pero aumenta por inducción con interferón tipo I, a través de un sitio IRF3 en el promotor de TRIM5 α , quedando así conectado con el sistema inmune [275].

7.2. TETERINA (BST-2 o CD317)

La teterina fue identificada como la proteína responsable de provocar el fallo en la salida de la célula de los viriones de nueva formación en la infección por el virus HIV-1 deficiente en el gen accesorio *vpu* [98, 99]. Este hecho concordaba con observaciones anteriores donde la delección del gen *vpu* en HIV-1 correspondía con el descenso de 5 a 10 veces de la salida del virus de células T, sin detectarse ningún fallo en la expresión del resto de los genes virales [276]. Se demostró que esta deficiencia en la salida era dependiente del tipo celular y que las partículas virales maduras permanecían ancladas a la célula en ausencia de Vpu, acumulándose en la membrana plasmática y en compartimentos celulares [277]. El responsable de ello resultó ser un factor de restricción expresado en la superficie de las células e inducible por interferón, la teterina [278, 279]. Además, se evidenció la unión física de la teterina a las partículas virales Δvpu en la superficie celular y en compartimentos celulares, y que Vpu y la teterina interactúan por medio de sus hélices transmembrana [280, 281].

Estudios con una proteína artificial diseñada con dominios topológicamente similares a los que componen la teterina pero sin homología en la secuencia, revelan que el determinante de la función es la estructura y no la secuencia aminoacídica, ya que la proteína artificial restringe la liberación de los viriones de forma similar a la teterina natural. La teterina inhibe la salida de los virus anclándolos directamente a la célula, por lo que no requeriría de cofactor celular alguno y no se daría un reconocimiento específico de las proteínas virales, como es el caso de otros factores de restricción. De hecho, la teterina se concentra en las zonas por las que el virus realiza la salida de la célula y se incorpora en la membrana lipídica de los viriones, atándolos así a la membrana celular [282].

La estructura de la teterina incluye un dominio amino terminal citoplasmático, un dominio transmembrana, un dominio extracelular Coiled-coil y un dominio de anclaje a membrana C-terminal de glicosilfosfatidil inositol (GPI) [99]. Esta estructura posibilitaría, de manera simultánea, asociarse tanto a la envoltura viral como a la membrana celular. Los dímeros de teterina adoptan una configuración axial en su

estado funcional y tanto el par de dominios transmembrana como el par de anclajes GPI pueden insertarse en las partículas virales que se están ensamblando, quedando atrapados en la membrana celular mediante el par de anclajes restante. Se ha demostrado preferencia del par de anclajes GPI por la unión al virus y a la célula por los dominios transmembrana, que dejaría el dominio N-terminal expuesto al citoplasma de la célula donde podría ejercer su función efectora [283]. Por un lado, los viriones capturados se internalizan por endocitosis y se degradan en lisosomas, por lo que la teterina tiene que interactuar con la maquinaria endocítica [284] y por el otro, se ha observado que la teterina inicia cascadas de señalización, activando el sistema inmune innato [22].

El espectro de restricción de la teterina humana es amplio, y además de inhibir la liberación de varios retrovirus también inhibe filovirus o herpesvirus [285, 286]. No todos los virus poseen la proteína accesoria Vpu para contrarrestar la Teterina, por lo que han desarrollado otros mecanismos para poder hacer frente a la restricción por teterina. Por ejemplo, en el caso de SIV la proteína accesoria Nef acelera la endocitosis [287], y en infecciones por HIV-2 la proteína Env acelera la internalización de la teterina [288]. Sin embargo, no se han descrito proteínas en el genoma de SRLV capaces de contrarrestar la acción de la teterina ovina.

La interacción de distintas proteínas virales de lentivirus de primates mediante mecanismos diversos con la teterina pone de manifiesto la contribución de este factor de restricción en la evolución de esos lentivirus. De igual manera, la teterina ha co-evolucionado, evidenciando selección positiva en la cola citoplasmática por donde ejerce su acción antagonista Nef, y en el dominio transmembrana que gobierna la sensibilidad del antagonismo ejercido por Vpu [281]. Fruto de esta coevolución podría ser el hecho de que las proteínas antagonistas de la teterina posean especificidad de especie [287, 289].

7.3. APOBEC3 (CEM15)

La familia de las proteínas APOBEC, apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide, está caracterizada por la presencia de uno o dos motivos de unión a Zn^{2+} con la secuencia consenso $HxEx_{23-28}PCx_{2-4}C$ (dominio Z) que cataliza la desaminación de citosinas en un amplio espectro de dianas ADN y ARN. Estas proteínas eliminan el grupo amino (NH_2) de las citosinas convirtiéndolas en uracilos [290]. A esta familia pertenecen la proteína **AID** (*activation-induced cytidine deaminase*) involucrada en la hipermutación somática y la diversificación de anticuerpos, **APOBEC1** que edita el RNAm de la apolipoproteína B introduciendo un codón stop y creando dos RNAm distintos importantes en el metabolismo lipídico, **APOBEC2** relacionado con la diferenciación muscular, **APOBEC3** que restringe retroelementos y diferentes tipos de virus y **APOBEC4** que se ha localizado en testículos aunque su función no ha sido aún determinada.

El estudio de las secuencias A3 de artiodáctilos como cerdos, ovejas o vacas, sugieren que el ancestro común con los primates poseía un repertorio A3 constituido por tres dominios desaminasa o Z (Z1, Z1 y Z3) [291]. Mediante procesos de recombinación y bajo la selección ejercida por infecciones con antiguos retrovirus, este repertorio se habría expandido en humanos hasta alcanzar los ocho genes que presenta en la actualidad (A3A-H), que se traducen en tres proteínas con un dominio Z único (A3A, A3C y A3H) y cuatro con dos dominios desaminasa (A3B, A3DE, A3F y A3G) [292] (Figura 5). Ovinos y bovinos presentan tres dominios Z, aunque por medio de corte y empalme génico (*splicing*) alternativo codifican cuatro proteínas (A3Z1, A3Z2, A3Z3 y A3Z2Z3), todas ellas con actividad citosina desaminasa sobre DNA de cadena simple. A3Z2Z3 se localiza en el citoplasma, mientras que las demás se encuentran también en el núcleo.

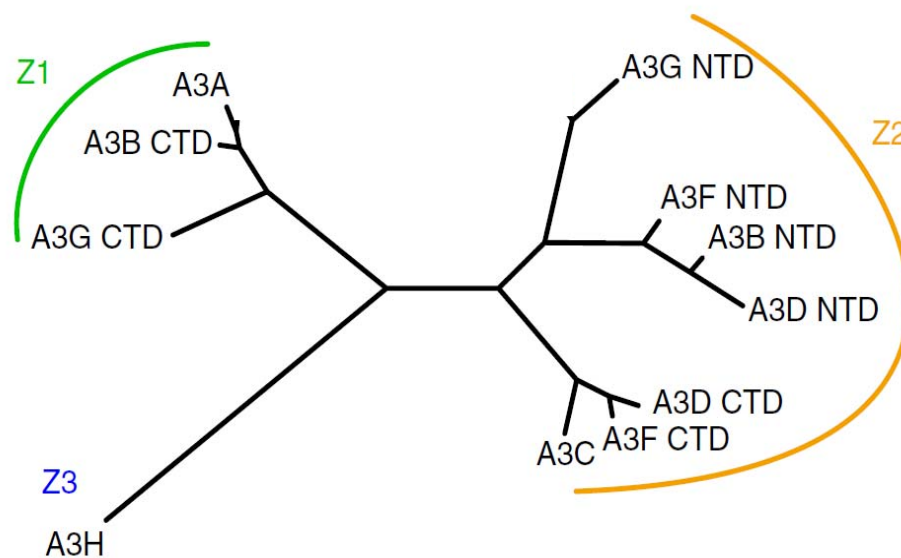


Figura 5. Similitud de las secuencias de amino ácidos de las proteínas APOBEC3 humanas. Las secuencias amino acídicas de los dominios catalíticos amino-terminal (NTD) y carboxi-terminal (CTD) de las distintas proteínas APOBEC3 de humano han sido alineadas mediante el programa Clustal W60 y la longitud de las líneas representa la similitud de secuencias. Las proteínas APOBEC3 se agrupan en Z1, Z2 y Z3. Extraído de [293].

La primera proteína APOBEC3 (A3) identificada fue A3G durante el estudio de la proteína accesoria Vif de HIV-1. Se había observado que Vif era necesaria para la infección de algunos tipos celulares, pero no de otros [27]. La fusión de células permisivas y no permisivas daba lugar a células híbridas que mantenían el fenotipo restrictivo, sugiriendo la existencia de algún factor celular antiviral [294]. Sheehy y colaboradores aislaron en el año 2002 la proteína celular responsable de inhibir el virus HIV-1 en ausencia de Vif, CEM15, que más tarde se denominaría A3G [36].

Las proteínas A3 han sido ampliamente estudiadas en la restricción de lentivirus como HIV, SIV o EIAV [295-297]. Cabe destacar que investigaciones en HIV con cohortes de pacientes han confirmado una mayor expresión de A3G en personas expuestas seronegativas y en individuos controladores de la replicación, en comparación con personas sanas y pacientes progresores típicos, lo que refuerza la importancia de la actividad antiviral de A3 *in vivo* [298-300].

A3 también ejerce su actividad frente a otros retrovirus incluyendo gammaretrovirus (virus de la leucemia murina, virus del tumor mamario de ratón) [301, 302], virus del sarcoma de Rous [303], virus de la leucemia humana de células T tipo 1 [304] y virus espumosos [305]; o frente a virus de otras familias, como virus de la hepatitis B [306, 307], parvovirus [308], virus del herpes simple 1 [309] y papilomavirus [310] con diferentes grados de intervención de la actividad enzimática dependiendo de si los estudios se han llevado a cabo *in vivo* o *in vitro*. Además inhiben retrotransposones con o sin LTR [311]. Se ha sugerido que las proteínas A3 existen, por lo menos en parte, para prevenir la transmisión zoonótica de los virus [312].

7.3.1. MECANISMOS DE ACCIÓN

Las proteínas A3 son empaquetadas en las partículas virales que se forman en las células infectadas y son transportadas por el mismo virus a la próxima célula diana donde ejercerán su acción. A3 inhibe la replicación viral mediante **mecanismos dependientes e independientes de desaminación**. Durante la retrotranscripción del RNA viral A3 puede unirse a la cadena simple de DNA (-) y provocar la desaminación de citosinas (C) a uracilos (U), que provocará una mutación de guanina (G) a adenina (A) en la cadena de DNA positiva. Las cadenas de DNA que contienen uracilos son diana de la uracil-DNA glicosilasa (UNG), que al ejercer su acción provoca un sitio abásico que conllevará la degradación del DNA mediante endonucleasas. De hecho, algunos autores han demostrado la incorporación de UNG en las partículas de HIV-1 a través de interacciones con las proteínas del virión Vpr o Integrasa [313, 314]. El uracilo de las cadenas que no son degradadas es sustituido por timina (T) y el DNA proviral continúa el ciclo insertándose en el genoma celular. Las hipermutaciones de G a A provocan cambios aminoacídicos en las proteínas y acumulación de codones stop que provocan virus defectuosos e incluso llegan a ser letales para la viabilidad viral [315]. Por otro lado, una tasa de cambios o mutaciones por debajo de la hipermutación letal puede contribuir a aumentar la heterogeneidad de los lentivirus y su adaptación al hospedador [316].

Las distintas proteínas A3 desaminan preferentemente citosinas localizadas en un contexto específico. Así, A3G muta la citosina subrayada en un contexto 5'-CC a CU en la cadena negativa que provoca mutaciones 5'-GG a AG en la positiva, mientras que A3B, A3DE, A3F, A3H y A3A tienen predilección por la desaminación 5'-TC a TU que causa mutaciones 5'-GA a AA en la cadena positiva; A3DE también muta 5'-GC a GU que da lugar a mutaciones 5'-GC a AC [317]. Los tres tipos de mutaciones han sido observados en pacientes con HIV-1, aunque aún no se ha descubierto qué proteína provoca las mutaciones 5'-GT a AT.

Además, A3 muestra preferencia por algunas regiones del genoma viral que son hipermutadas de manera más extensa que otras. El DNA proviral hipermutado exhibe dos gradientes o *twin gradient*, uno con aumento de frecuencia de mutaciones que va desde el PBS al tracto de polipurinas central (cPPT) localizado en el gen *pol*, concretamente en la integrasa, y un segundo gradiente con incremento de frecuencia mutacional desde el cPPT hasta el tracto de polipurinas 3' (3'PTT) inmediatamente en dirección 5' (*upstream*) de la 3'-LTR [318]. Tanto cPPT como 3'PTT son regiones del genoma viral resistentes a la actividad de la RNAasa H y se utilizan como cebadores para la síntesis de la cadena de DNA positiva. Se considera que estos gradientes están relacionados con la mayor accesibilidad de la cadena simple de DNA negativa a las proteínas A3 durante la retrotranscripción, es decir, con el tiempo que la cadena de DNA negativa permanece como cadena simple.

Las proteínas A3 con dos motivos coordinados de Zn no suelen mostrar actividad desaminasa en ambos dominios, excepto A3B. Así, las proteínas A3G o A3F de humano ejercen su actividad desaminasa mediante el dominio Z C-terminal, mientras que el dominio N-terminal no es catalíticamente activo, sino que tiene gran afinidad por el RNA y determina la capacidad de empaquetamiento en los viriones [319]. Esta distribución de la actividad en los diferentes dominios Z no está generalizada en todas las proteínas A3 con dos dominios. A3Z2Z3 de artiodáctilos, homólogo a A3F humano, concentra su actividad desaminasa en el dominio Z N-terminal y no en el C-terminal, y además exhibe un patrón de preferencia de dinucleótidos más amplio [320].

En cuanto a la interacción virus-hospedador, diferentes estudios han determinado los motivos aminoacídicos de la secuencia de A3 que son relevantes para el empaquetamiento en los viriones, la interacción con Vif o residuos fuera del dominio Z que son críticos para la actividad enzimática (revisado en [317]). Aunque algunos motivos se conservan en distintas proteínas A3, también se observan diferencias. La proteína A3G se empaqueta en los viriones de HIV-1 por medio de la interacción dependiente de RNA entre el dominio Z N-terminal y el motivo ¹²⁴YYxW¹²⁷ con la nucleocápside vírica, motivo que también utiliza A3H [321-323]. El residuo triptófano (Y) 315 situado en el motivo de unión a DNA de A3G, también presente en A3F, es crucial para la actividad desaminasa, y su reemplazo por una cisteína (C) en A3DE provoca una disminución drástica de la actividad [324]. Con respecto a la interacción con Vif, A3F, A3DE y A3C utilizan el motivo EFLARH en dirección 3' (*downstream*) del dominio Z activo, mientras que A3G emplea el motivo ¹²⁸DPDY¹³¹ próximo al dominio Z N-terminal no activo [325, 326]. Estos motivos de unión a Vif podrían ser diana para nuevas terapias génicas en la lucha contra infecciones lentivirales.

Además de la actividad desaminasa descrita hasta ahora, también se han observado **mecanismos independientes de la actividad desaminasa** en relación a la actividad antiviral [327]. A3 es capaz de bloquear físicamente la retrotranscripción impidiendo el alineamiento del iniciador de tRNA^{Lys-3} al RNA genómico por unión a la nucleocápside viral [328], reduciendo la procesabilidad de la RT en la elongación [329], o inhibiendo la transferencia de las cadenas de DNA viral en el cebado de la retrotranscripción que está relacionada con la capacidad de A3 de prevenir la degradación del RNA por RNAasa H en el híbrido RNA/DNA [330]. También se ha relacionado con el bloqueo de la integración del provirus en el genoma celular [331, 332]. Este mecanismo independiente de desaminasa ha sido muchas veces cuestionado porque parece estar en relación con la cantidad de proteína presente y se ha especulado que podrían darse sólo en modelos de sobreexpresión de A3. Sin embargo, estudios recientes con niveles fisiológicos de A3 demuestran tanto hipermutación como inhibición de la retrotranscripción en células T CD4⁺ [333].

La capacidad antiviral de A3 puede estar relacionada con la conformación que adopta en las células. En células T CD4⁺ de sangre periférica *resting* o no estimuladas, refractarias a la infección por HIV-1, A3G se encuentra predominantemente en una forma de bajo peso molecular (*low molecular mass*, LMM) enzimáticamente activa [334]. La estimulación de las células no activas con mitógenos *in vitro* produce el reclutamiento de A3G LMM en complejos de alto peso molecular (*high molecular mass*, HMM) de 5-15 MDa donde la actividad citosina desaminasa está inhibida, al mismo tiempo que aumenta la permisividad a la infección por el virus. Además, Vif se ensambla con A3G presente en los complejos HMM y lo poliubiquitina. El tratamiento de A3 HMM con RNAasa A libera las formas LMM activas, lo que manifiesta la naturaleza ribonucleoproteica de HMM. Las células T CD4⁺ *resting* de órganos linfoides, en cambio, son permisivas a la infección [335] y precisamente A3G se encuentra en complejos HMM inducidos por el ambiente de citoquinas presente [336]. De la misma manera, la resistencia/permisividad a la infección de monocitos/macrófagos se correlaciona con la presencia de las formas LMM/HMM de A3G, respectivamente [114, 334, 337]. Pese a todas estas evidencias, no se ha demostrado una relación directa entre A3G y la restricción de HIV-1 en las células T CD4⁺ *resting*, ya que el silenciamiento del RNAm de A3G o la supresión de la proteína mediante la expresión de Vif en estas células no revierte la resistencia a la infección [338, 339]. La conformación de A3 incorporado en los viriones o *passenger* también ha sido cuestionada, pudiendo darse tres opciones posibles: A3 formando complejos HMM, A3 LMM liberado de complejos HMM o A3 de nueva síntesis en forma LMM. Se ha determinado que la proteína A3G de los viriones de HIV-1 es de nueva formación y que la interacción con el RNA viral inhibe su actividad, activándose en la célula durante la retrotranscripción al degradarse el RNA por acción de la RNAasa H [340].

Estudios con A3G exógeno en células 293T y A3G endógeno en células T indican que existe un inhibidor de la actividad desaminasa en las células diana de los lentivirus que no está presente en las células 293T, por lo que muchos estudios podrían estar evidenciando procesos de restricción difícilmente trasladables *in vivo*

[341]. Los lisados de las líneas celulares que expresan A3G exógeno exhiben actividad desaminasa tras el tratamiento con RNAasas, que degradan los complejos inactivos HMM, mientras que la actividad desaminasa en células T CD4⁺ permanece casi indetectable. Los resultados sugieren que las células T expresan un factor inhibidor de la actividad desaminasa responsable de la baja hipermutación. Este inhibidor no caracterizado podría proteger el DNA del hospedador y podría tener implicaciones en la actividad antiviral de A3G *in vivo*.

7.3.2. NEUTRALIZACIÓN MEDIANTE VIF VIRAL

Todos los lentivirus, excepto EIAV, han co-evolucionado expresando la proteína accesoria Vif que contrarresta la acción antiviral de las proteínas A3 celulares mediante **mecanismos que implican degradación por el proteasoma**. Vif induce la poliubiquitinización y posterior degradación vía proteasoma de A3 mediante el secuestro del complejo E3 ubiquitina ligasa, compuesto por la proteína de andamiaje Cullin5 (Cul5), las elonginas B y C (EloB y EloC), la subunidad 2 RING-box (RBX2) y la enzima conjugadora E2 [342]. La interacción entre Vif y el complejo E3 ubiquitina ligasa se produce mediante tres motivos ubicados en el extremo C-terminal de la proteína accesoria: el motivo dedo de Zn HCCH (¹⁰⁸Hx₅Cx₁₇₋₁₈Cx₃₋₅H¹³⁹) se une a Cul5 [343, 344], ¹⁴⁴SLQYLA¹⁴⁹ del dominio BC-box a EloC [345, 346] y el motivo ¹⁶¹PPLP¹⁶⁴ a EloB [347]. Además, ¹⁶¹PPLP¹⁶⁴ también determina la dimerización de Vif y la interacción con A3G. Los motivos de Vif que interactúan con A3 también han sido determinados, y están ampliamente distribuidos por la región N-terminal (revisado en [317]), concretamente YRHHY a A3G [348] y DRMR a A3F [349]. El estudio de estos motivos, que son críticos para la interacción entre A3, Vif y el complejo E3 en la degradación de A3, podría originar nuevas terapias antivirales. Además, recientemente se ha descubierto que el cofactor CBF-β es necesario para facilitar la interacción Vif-Cul5 y producir la degradación de A3 vía proteasoma en humanos [350, 351]. Zhang y colaboradores han descrito recientemente que la degradación de A3Z2Z3 de ovinos mediante Vif de SRLV es dependiente del

proteasoma, pero independiente del factor CBF- β [352], añadiendo excepciones al mecanismo descrito en humanos.

La acción de Vif como supresor de la actividad antiviral de A3 es altamente específica de especie, es decir, generalmente la proteína Vif de un virus concreto puede inhibir A3 de su hospedador natural, pero no de otras especies. Así, A3G de humanos es inactivado por Vif de HIV-1 pero no por Vif de SIV aislado del mono verde africano [353]. Sin embargo, Vif de SIV aislado de macaco rhesus es más promiscuo y es capaz de inhibir A3G de distintas especies. En esta misma línea, LaRue y colaboradores observaron que Vif de ciertos lentivirus, entre ellos los SRLV, inhibe la actividad antiviral de A3 de su propia especie y de otras, aunque la eficacia es mayor frente a A3 de su hospedador [37].

La reducción de A3 producida por Vif suele ser mayor en los viriones que en las células productoras, lo que sugiere que Vif es capaz de bloquear la encapsidación de A3 por **mecanismos independientes de degradación** [354]. Aunque existen evidencias del bloqueo de A3 en ausencia de inducción de degradación vía proteasoma, no se ha descifrado aún el mecanismo de acción [354, 355].

7.3.3. EVOLUCIÓN DE LOS LENTIVIRUS

La diversificación de la población viral en el individuo infectado y la continua adaptación a su hospedador son acontecimientos que garantizan el éxito de la supervivencia de los lentivirus. Este hecho es resultado de la combinación de distintos factores: la amplia población viral infectante en quasi-especies, la alta tasa de replicación y de mutación, los eventos de recombinación y la presión selectiva por parte del hospedador [356]. La alta tasa de mutación se atribuye principalmente a la baja fidelidad de la RT, aunque también se ha propuesto que podría deberse a mutaciones sub-letales inducidas por las proteínas A3 [357, 358]. Se podría incluso especular con la posibilidad de que Vif actúe como regulador del nivel total de mutaciones y por ello interactúa con A3 [359]. Mutaciones letales por parte de A3 inhibirían la replicación viral, sin embargo, la incompleta neutralización de la actividad de A3 mediante Vif produciría mutaciones sub-letales que ayudarían a incrementar la

variabilidad genética de los lentivirus para evadir así el sistema inmune o los nuevos tratamientos farmacéuticos. Podrían darse distintos mecanismos por los que Vif no conseguiría una completa supresión de A3. Por un lado, la expresión de A3 se induce por la vía del interferón y el aumento de la expresión podría exceder los niveles de expresión de Vif. Por otro lado, el propio gen *vif* podría mutar por acción de A3 y perder parcial o completamente su actividad, no pudiendo inactivar A3 [360, 361]. Estas son consideraciones que deberán tenerse en cuenta a la hora de diseñar estrategias terapéuticas.

Las células diana de los lentivirus, principalmente macrófagos, poseen un alto contenido en uracilo, y el hecho de que la RT no distinga entre dUTP y dTTP conlleva una incorporación errónea de uracilos [362]. Si a esto se le suma la actividad desaminasa de las proteínas A3, que se expresan fuertemente en estas células inmunes, se obtiene una alta uracilación del DNA viral que se supone letal para la viabilidad del virus. Aunque los virus podrían haber evolucionado codificando proteínas que contrarresten la incorporación de uracilos, como una uracil-DNA glicosilasa (UNG) en virus vaccinia [363] y virus herpes simple tipo 1 [364]; o una dUTPasa en algunos retrovirus incluyendo los SRLV, EIAV o FIV. HIV no posee ninguna de las dos enzimas, y se ha sugerido que suprime los uracilos de la cadena de DNA por acción de la UNG2 celular que es incorporada en los viriones mediante interacción con Vpr o la integrasa (IN) [365, 366], aunque también se ha demostrado que HIV replica de igual manera en células carentes de UNG2 o en macrófagos con la actividad UNG suprimida [367]. Es más, el virus podría haber desarrollado mecanismos para tolerar, o incluso beneficiarse, de la alta uracilación. Durante el procesamiento 3' que realiza la IN activando los extremos de la doble cadena de DNA viral para preparar su integración en el cromosoma del hospedador, el DNA viral puede autointegrarse dando lugar a formas circulares que son degradadas. Yan y colaboradores han demostrado que la uracilación provoca cambios estructurales que bloquean la transferencia de los extremos del DNA por parte de la IN, evitando la autointegración y facilitando la integración en el DNA celular y la replicación viral [368]. La proporción de retrotranscritos que sufren autointegración suicida disminuye al incubar las células

con dUTP o al infectarlas con virus que contienen A3G. La uracilación del DNA viral facilitaría la unión al complejo celular SET que inhibe la autointegración en el citoplasma. Una vez en el núcleo, la actividad *base excision repair* del complejo SET suprimiría los uracilos permitiendo a la IN la integración en el DNA del hospedador en forma de provirus. La reparación de los pares U:A en el DNA cromosómico evitaría mutaciones que comprometerían la viabilidad del virus [369].

7.3.4. APOBEC3A

De entre las distintas proteínas A3 que se han estudiado, se considera que las más relevantes respecto a la actividad antiviral frente a HIV son A3DE, A3F y A3G, siendo A3G la más restrictiva de las tres [370, 371]. La mayor parte de las investigaciones se realizan en células T CD4⁺ ya que HIV es un lentivirus fundamentalmente linfotrópico. Sin embargo, todo un grupo de estirpes también infectan células de la línea monocito-macrófago que son reservorio, propagan la infección y contribuyen a la latencia del virus. Además, lentivirus como los SRLV, BIV y EIAV, infectan macrófagos pero no linfocitos. El repertorio de proteínas A3 y su mecanismo de acción pueden ser distintos en estas células mieloides comparado con el que se halla en células T y su estudio puede, no sólo ayudar a entender la respuesta innata en su globalidad, sino aportar nuevas estrategias de lucha contra los lentivirus.

Los macrófagos infectados replican un gran número de virus en su superficie y en membranas intracelulares donde los viriones se acumulan en vesículas [372]. Así, el virus no induce muerte en los macrófagos y pueden permanecer como reservorio de virus en tejidos durante largos periodos [373]. Las células monocíticas, en cambio, no son permisivas a HIV-1 ni soportan el ciclo viral. Las células dendríticas, tanto *in vivo* como *in vitro*, son infectadas o no dependiendo de su estado de maduración [374] y los monocitos derivados de sangre periférica son prácticamente impermeables a la infección [375, 376]. Pero la naturaleza de la diferencia en la permisividad a lentivirus entre monocitos y macrófagos aún no está clara y podría ser multifactorial. Se ha observado que no existe una diferencia en los niveles de expresión de receptores o correceptores [377]. Aunque, como veremos más adelante,

la expresión de A3A decae durante la maduración de monocitos a macrófagos, pudiendo tener un papel relevante en la restricción de la fase temprana de la infección por lentivirus en monocitos. A3A posee un único dominio desaminasa agrupado en el cluster filogenético Z1 [291, 378]. Las proteínas Z1 y Z2 se distinguen de Z3 por poseer el motivo SW-S/T-PC-x₂₋₄-C en vez del motivo TW-S-PC-x₂-C. Las proteínas Z1 y Z2 se diferencian entre sí por presentar los motivos H-x₁-E-x₅-X-V/I y H-x₁-E-x₅-W-F respectivamente. Además, Z1 posee una única isoleucina en el motivo conservado RIY localizado hacia la región C-terminal de los residuos coordinados de zinc.

A3A restringe al virus T-linfotrópico tipo 1 humano mediante desaminación [379] y causa hipermutaciones G →A en el genoma del Papilomavirus humano [310], herpes simplex 1 y Epstein Barr virus [309]. Inhibe también retrotransposones [380, 381] y la replicación de virus adeno-asociados sin mostrar mutaciones [382], parvovirus sin necesidad de la actividad desaminasa [308] y virus de la hepatitis B mediante desaminación [383]. Además, se ha relacionado con la inducción de la respuesta de daño de DNA [384] y la destrucción de DNA de doble cadena foráneo mediante desaminación [385]. A3A puede incluso hipermutar el DNA nuclear [386], hecho que podría tener relevancia en procesos patológicos como la inestabilidad genómica o el desarrollo de cáncer. Las mutaciones en el DNA nuclear pueden ser reparadas mediante el mecanismo *base excision repair* o exceder este mecanismo y provocar apoptosis celular [387, 388]. En el caso de que la hipermutación no conlleve la muerte celular, podrían fijarse mutaciones en el genoma. En algunos tipos de cáncer se han identificado regiones que concentran transiciones C→T focalizados en el dinucleótido TC conocidas como *Kataegis* [389], compatible con el contexto de desaminación de A3A. Una expresión de A3A continua, como puede darse bajo la inducción por IFN-α o IFN-γ en inflamaciones crónicas, podría provocar estos daños en el DNA nuclear. El papel de A3A en el catabolismo del DNA es conocido y está conservado en las proteínas ortólogas de monos, bovinos, ovinos, equinos, perros y pandas, manteniendo la capacidad para mutar el DNA nuclear, residuos citidina 5'-metilados e inducir la ruptura de la doble cadena de DNA [390]. Recientemente A3A

se ha implicado en la edición de mRNA, concretamente en transcritos de la proteína Wilms Tumour 1, ampliando las funciones de la familia APOBEC3 y su posible relación con el cáncer [391].

Se ha observado que la expresión de A3A está confinada a la línea monocítica o a órganos que tienen un número elevado de estas células, como son el pulmón o el bazo, y que además su expresión está positivamente regulada por IFN α [295, 392, 393]. El tratamiento de macrófagos derivados de sangre (BDM) con esta citoquina inhibe la infección por HIV-1, aunque en un principio se dio más relevancia a la restricción por A3G que por A3A. Ya en los años 80 se constató que la maduración de monocitos a macrófagos iba acompañada de un aumento en la susceptibilidad a la infección por lentivirus y un incremento de la expresión de genes virales, aunque no se conocía el mecanismo subyacente [57, 58]. En el año 2007 Peng y colaboradores demostraron que este hecho se acompañaba de una disminución en la expresión de A3G y A3A. La estimulación de los BDM con IFN α o IFN γ proporcionaba resistencia a la infección a la vez que aumentaba la expresión de A3, sobre todo de A3A. El silenciamiento de A3A en monocitos con el consiguiente bloqueo de la resistencia a HIV-1 terminó de correlacionar la susceptibilidad a la infección y la expresión de A3A [114]. La polarización de macrófagos derivados de monocitos a M1 *in vitro* restringe pasos del ciclo viral tanto en la pre-integración como en la post-integración de HIV-1, probablemente relacionados con la expresión de A3A [394]. En pequeños rumiantes, la proteína A3Z1 análoga a A3A ha sido propuesta como marcador de macrófagos M1 resistentes a la infección por SRLV tras la estimulación con IFN γ [395].

La estimulación de monocitos primarios con citoquinas en investigaciones similares ponen de manifiesto que en humanos se expresan dos isoformas de A3A distintas, una de ellas comenzando en la metionina 13 del gen, y que éstas muestran actividad desaminasa en el dinucleótido T \underline{C} y no C \underline{C} mediante un ensayo *in vitro* [341, 396]. Recientemente se ha descrito que A3A juega un papel crítico en la fase temprana de la infección por HIV mediante un mecanismo novedoso [397]. Las células mieloides primarias infectadas con el lentivirus inducen la expresión de A3A tanto a nivel de mRNA como de proteína, inducción que confiere protección frente a

HIV-1. La restricción está acompañada de acumulación de DNA viral, lo que sugiere que A3A interfiere en algún paso temprano de la retrotranscripción. Además, se observa un nivel bajo de nucleótidos editados, que refuerza la idea de que la inhibición no se da exclusivamente por la actividad enzimática de las proteínas. Así, no es el A3A de la célula productora o *passenger* el que está restringiendo la replicación viral, sino el pool de A3A presente en la propia célula diana o *celular* la que inhibe el virus entrante. Otros autores también han destacado la importancia de A3A *celular* como factor restrictivo en macrófagos estimulados, con un nivel bajo de mutaciones [398], o de A3G/3F como resistencia intrínseca en células dendríticas [399]. Se ha especulado que A3A *passenger* no restringe HIV-1 carente de Vif debido a su baja incorporación dentro del complejo de la nucleocápside durante la maduración del virus. Ensayos que elevan la incorporación de A3A en las partículas virales, mediante la fusión del dominio N-terminal de A3G o mediante la fusión a la proteína accesoria Vpr, muestran un aumento de la actividad restrictiva de A3A y un aumento de las mutaciones en el DNA viral [400, 401].

Investigaciones realizadas en modelos *in vivo* apuntan también en esa dirección. Ratones A3 *knockout* que expresan A3A o A3G humano restringen la infección por retrovirus murinos, pero mediante distintos mecanismos [402]. A3G se incorpora en los viriones, produce desaminación en el genoma de los retrovirus y su acción es inhibida por Vif de HIV. A3A, en cambio, no se introduce en los viriones y media la restricción cuando se expresa en las células diana y la tasa de mutaciones en el DNA viral es baja (Figura 6).

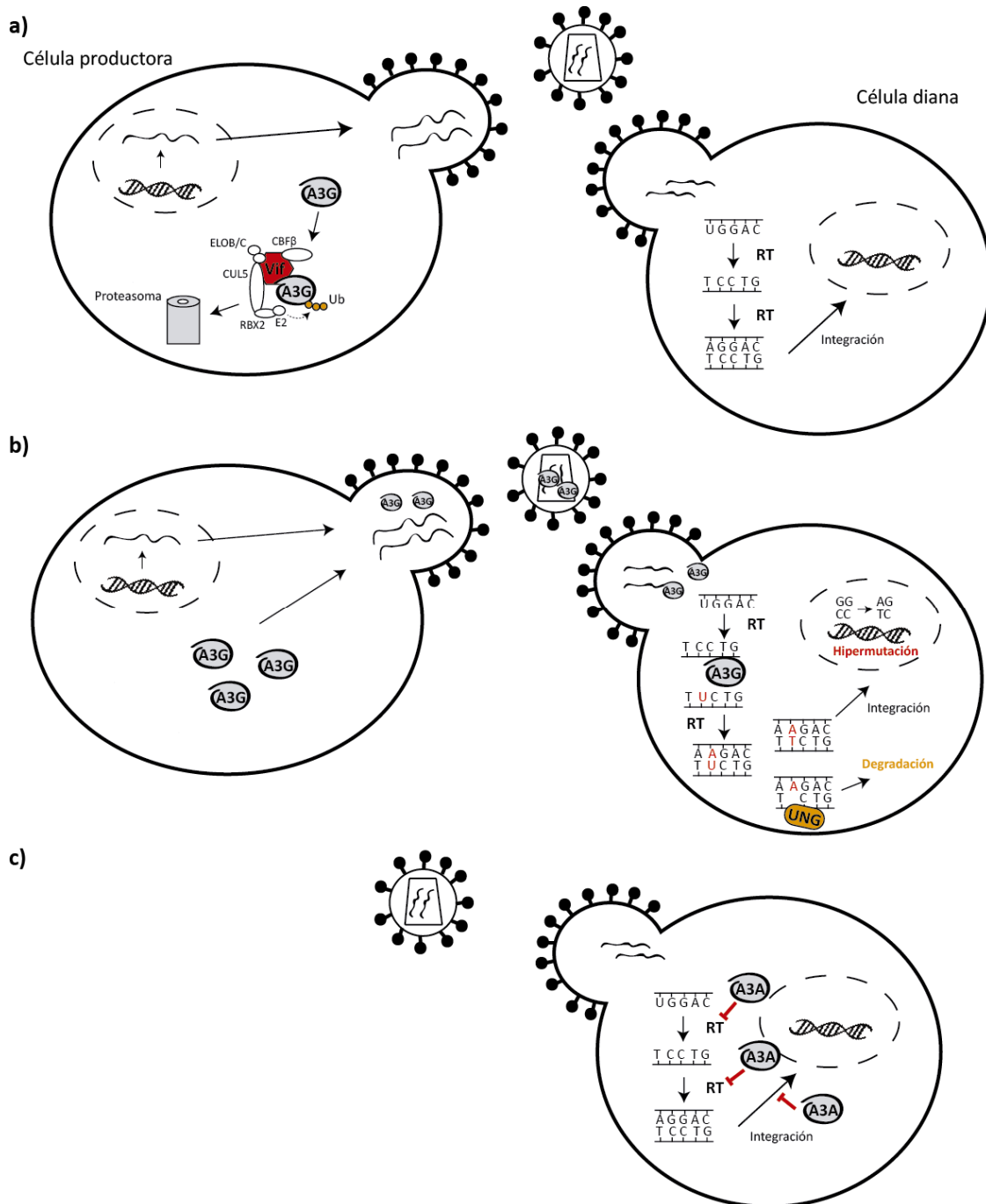


Figura 6. Mecanismos de acción de APOBEC3 y neutralización por Vif viral. a) APOBEC3G es sequestrado por la proteína Vif viral y degradado vía proteasoma en la célula productora, dando una infección productiva en la célula diana. b) APOBEC3G es incorporado en los viriones de nueva formación en la célula productora, APOBEC3 *passenger*, provocando hipermutaciones o la degradación del DNA proviral en la célula diana a través de la actividad desaminasa. c) Restricción viral por APOBEC3A de la propia célula diana, APOBEC3 *cellular*, mediante mecanismos independientes de desaminación (bloqueo de la retrotranscripción y la integración).

La región AC-loop-1 situada en el dominio N-terminal de A3A ha sido identificada como una secuencia de 10 amino ácidos importante en la restricción de lentivirus de especies distintas al hospedador natural [403]. Esta restricción por A3A *celular* se da mediante mecanismos independientes de desaminasa, ya que proteínas truncadas carentes de dominio Z pero con la región AC-loop-1 intacta siguen manteniendo su poder antiviral [404].

7.3.5. APOBEC3 OVINO

Las ovejas presentan tres genes A3 que codifican cuatro proteínas, A3Z1, A3Z2, A3Z3 y A3Z2Z3, todas ellas con actividad DNA citosina desaminasa [291].

En cuanto a la capacidad de los distintos A3 ovinos para inhibir la replicación de lentivirus, el más estudiado ha sido A3Z2Z3. Se ha observado que restringe HIV-1, MLV y SRLV carente de Vif. Esta restricción se puede atribuir tanto a mecanismos dependientes como independientes de la actividad desaminasa, ya que mutantes sin actividad desaminasa conservan una actividad antiviral significativa [320]. Las proteínas A3G y A3F humanas con doble dominio Z presentan actividad desaminasa en el dominio C-terminal, mientras que A3Z2Z3 de ovinos y bovinos concentran la actividad desaminasa en el dominio N-terminal.

Vif de SRLV es esencial para la replicación viral [35], y se ha demostrado que neutraliza tanto A3Z2Z3 como A3Z3 ovino [37]. Mientras que las proteínas A3 restringen un amplio rango de retrovirus y retroelementos, las proteínas Vif virales suelen contrarrestar la actividad antiviral de A3 de su propia especie. Aunque pueden darse excepciones, ya que Vif ovino parece ser especialmente promiscuo al degradar no sólo A3Z3 ovino sino también su homólogo en humanos, macacos, bovinos y gatos. Vif de BIV, en cambio, sólo es capaz de neutralizar A3Z3 de bovinos [37]. Así, la interacción Vif-A3Z3 puede ser promiscua, pero a pesar de esta tendencia la proteína Vif de cada lentivirus está optimizada para degradar A3Z3 de su hospedador.

Para la degradación de A3G vía proteasoma, Vif de HIV-1 se une a EloC del complejo E3 ubiquitina ligasa a través del motivo SLQYLA [345]. La secuencia correspondiente en Vif de SRLV es SLQRLA, y la mutación de SLQ→AAA inhabilita a Vif

para degradar A3 ovino [37], lo que sugiere que los SRLV utilizan un mecanismo similar a los lentivirus de primates para degradar las proteínas A3. Vif de SRLV carece del motivo HCCH de unión a Cul5 [343] aunque es capaz de coimmunoprecipitar Cul5 para degradar A3Z2Z3 vía proteasoma [352]. Además no precisa del cofactor CBF- β para la degradación de A3Z2Z3 ovino [352], por lo que el mecanismo podría ser distinto. Recientemente se han analizado los polimorfismos presentes en los genes A3 en dos poblaciones de ovinos de raza Latxa y Assaf [405]. Mientras que en los genes A3Z2 y A3Z3 no se han detectado polimorfismos, en el gen A3Z1 se han encontrado 16 SNPs y una delección de tres nucleótidos, que podrían ser resultado de la presión evolutiva sufrida por la infección de retrovirus. Este hecho podría indirectamente manifestar una interacción entre A3Z1 y lentivirus capaces de infectar células de la línea mieloide que son diana de los SRLV in vivo, sugiriendo una mayor importancia de la restricción por A3Z1.

Así, A3A en humanos y A3Z1 en ovinos podrían ser factores de restricción importantes en la resistencia de los monocitos y su ausencia podría justificar la permisividad de los macrófagos, que actuarían como reservorio de la infección.

En esta tesis pretendemos finalmente estudiar en profundidad la relación entre la resistencia natural y la presencia de A3Z1 así como su papel en la restricción de distintos lentivirus.

REFERENCIAS

1. Christodoulouopoulos G (2006) Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Ruminant Research* 62: 47-53.
2. Peterhans E, Greenland T, Badiola J, Harkiss G, Bertoni G, et al. (2004) Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res* 35: 257-274.
3. Keen JE, Hungerford LL, Littledike ET, Wittum TE, Kwang J (1997) Effect Of Ewe Ovine Lentivirus Infection On Ewe and Lamb Productivity. *Preventive Veterinary Medicine* 30: 155-169.
4. Pekelder JJ, Veenink GJ, Akkermans JP, van Eldik P, Elving L, et al. (1994) Ovine lentivirus induced indurative lymphocytic mastitis and its effect on the growth of lambs. *Vet Rec* 134: 348-350.
5. Martinez-Navalon B, Peris C, Gomez EA, Peris B, Roche ML, et al. (2013) Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Vet J* 197: 311-317.
6. Leitner G, Krifucks O, Weisblit L, Lavi Y, Bernstein S, et al. (2010) The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet J* 183: 328-331.
7. Reina R, Glaria I, Benavides J, de Andres X, Crespo H, et al. (2007) Association of CD80 and CD86 expression levels with disease status of Visna/Maedi virus infected sheep. *Viral Immunol* 20: 609-622.
8. Perez M, Biescas E, de Andres X, Leginagoikoa I, Salazar E, et al. (2010) Visna/maedi virus serology in sheep Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragon (Spain). *Veterinary Journal* 186: 221-225.
9. Zaroni RG (1998) Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J Gen Virol* 79 (Pt 8): 1951-1961.
10. Shah C, Huder JB, Boni J, Schonmann M, Muhlherr J, et al. (2004) Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J Virol* 78: 7518-7522.
11. Sigurdsson B, Thormar H, Pálsson P (1960) Cultivation of visna virus in tissue culture. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 10: 368-381.
12. Cork LC, Hadlow WJ, Crawford TB, Gorham JR, Piper RC (1974) Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J Infect Dis* 129: 134-141.
13. Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, Cork LC (1980) Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 207: 997-999.
14. Badiola J, Gonzalez, L., Gelabert, JL. Demonstration of Maedi Visna in Spain.; 1983; Edimburgh.
15. Luján L, Badiola JJ, García Marin JF, Moreno B, Vargas MA, et al. (1993) Seroprevalence of maedi-visna infection in sheep in the north-east of Spain. *Prev Vet Med* 15: 181-190.
16. Gonzalez L, Gelabert JL, Marco JC, Saez de Okariz C (1987) Caprine arthritis-encephalitis in the Basque country, Spain. *Vet Rec* 120: 102-109.
17. Benavides J, Gomez N, Gelmetti D, Ferreras MC, Garcia-Pariente C, et al. (2006) Diagnosis of the nervous form of Maedi-Visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y Leon, Spain. *Vet Rec* 158: 230-235.
18. Glaria I, Reina R, García I, Mora MI, Luján L, et al. (2003) Diagnóstico de la infección por el virus Maedi Visna, mediante elisa en suero y leche individual y de tanque en ovinos Latxa Navarra y comparación de seroprevalencia con Raza Navarra. *ITEA Extra nº 24 (I)*: 408-410.
19. Contreras A, Corrales JC, Sanchez A, Aduriz JJ, Gonzalez L, et al. (1998) Caprine arthritis-encephalitis in an indigenous Spanish breed of dairy goat. *Vet Rec* 142: 140-142.
20. Biescas E (2006) Contribución al estudio serológico, lesional, diagnóstico y preventivo del Maedi Visna ovino. Zaragoza: Universidad de Zaragoza. 231 p.
21. Sanchez AB, Rodriguez D, Garzon A, Amorena B, Esteban M, et al. (2002) Visna/maedi virus Env protein expressed by a vaccinia virus recombinant induces cell-to-cell fusion in cells of different origins in the apparent absence of Env cleavage: role of glycosylation and of proteoglycans. *Arch Virol* 147: 2377-2392.
22. Yan N, Chen ZJ (2012) Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol* 13: 214-222.

23. Ramirez H, Reina R, Bertolotti L, Cenoz A, Glaria I, et al. (2012) Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Veterinary Research* 8.
24. Pisoni G, Moroni P, Turin L, Bertoni G (2007) Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology*.
25. Rosati S, Mannelli A, Merlo T, Ponti N (1999) Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res* 61: 177-183.
26. Terai C, Carson DA (1991) Pyrimidine nucleotide and nucleic acid synthesis in human monocytes and macrophages. *Exp Cell Res* 193: 375-381.
27. Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, et al. (1987) The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* 328: 728-730.
28. Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, et al. (1992) Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 66: 6489-6495.
29. Reddy TR, Kraus G, Suhasini M, Leavitt MC, Wong-Staal F (1995) Identification and mapping of inhibitory sequences in the human immunodeficiency virus type 2 vif gene. *J Virol* 69: 5167-5170.
30. Desrosiers RC, Lifson JD, Gibbs JS, Czajak SC, Howe AY, et al. (1998) Identification of highly attenuated mutants of simian immunodeficiency virus. *J Virol* 72: 1431-1437.
31. Tomonaga K, Norimine J, Shin YS, Fukasawa M, Miyazawa T, et al. (1992) Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity. *J Virol* 66: 6181-6185.
32. Lockridge KM, Himathongkham S, Sawai ET, Chienand M, Sparger EE (1999) The feline immunodeficiency virus vif gene is required for productive infection of feline peripheral blood mononuclear cells and monocyte-derived macrophages. *Virology* 261: 25-30.
33. Harmache A, Bouyac M, Audoly G, Hieblot C, Peveri P, et al. (1995) The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J Virol* 69: 3247-3257.
34. Harmache A, Russo P, Guiguen F, Vitu C, Vignoni M, et al. (1996) Requirement of caprine arthritis encephalitis virus vif gene for in vivo replication. *Virology* 224: 246-255.
35. Kristbjornsdottir HB, Andresdottir V, Svansson V, Torsteinsdottir S, Matthiasdottir S, et al. (2004) The vif gene of maedi-visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro. *Virology* 318: 350-359.
36. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418: 646-650.
37. Larue RS, Lengyel J, Jonsson SR, Andresdottir V, Harris RS (2010) Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. *J Virol* 84: 8193-8201.
38. da Costa KS, Leal E, dos Santos AM, Lima e Lima AH, Alves CN, et al. (2014) Structural analysis of viral infectivity factor of HIV type 1 and its interaction with A3G, EloC and EloB. *PLoS One* 9: e89116.
39. Tiley LS, Malim MH, Cullen BR (1991) Conserved functional organization of the human immunodeficiency virus type 1 and visna virus Rev proteins. *J Virol* 65: 3877-3881.
40. Toohey KL, Haase AT (1994) The rev gene of visna virus is required for productive infection. *Virology* 200: 276-280.
41. Villet S, Bouzar BA, Morin T, Verdier G, Legras C, et al. (2003) Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein. *J Virol* 77: 9632-9638.
42. Barros SC, Andresdottir V, Fevereiro M (2005) Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Arch Virol* 150: 201-213.
43. Hess JL, Small JA, Clements JE (1989) Sequences in the visna virus long terminal repeat that control transcriptional activity and respond to viral trans-activation: involvement of AP-1 sites in basal activity and trans-activation. *J Virol* 63: 3001-3015.

44. Sutton KA, Lin CT, Harkiss GD, McConnell I, Sargan DR (1997) Regulation of the long terminal repeat in visna virus by a transcription factor related to the AML/PEBP2/CBF superfamily. *Virology* 229: 240-250.
45. Angelopoulou K, Brellou GD, Greenland T, Vlemmas I (2006) A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus Res* 118: 178-184.
46. Campbell BJ, Avery RJ (1996) Sequence analysis and transcriptional activity of the LTR of OLV-CU1, a North American ovine lentivirus. *J Gen Virol* 77 (Pt 12): 2999-3004.
47. Tong-Starksen SE, Sepp T, Pagtakhan AS (1996) Activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat by gamma interferon. *J Virol* 70: 595-599.
48. Murphy B, Jasmer DP, White SN, Knowles D (2007) Localization of a TNF-activated transcription site and interactions with the gamma activated site within the CAEV U3 70 base pair repeat. *Virology* 364: 196-207.
49. Trono D (1992) Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J Virol* 66: 4893-4900.
50. Besnier C, Takeuchi Y, Towers G (2002) Restriction of lentivirus in monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11920-11925.
51. Crane SE, Buzy J, Clements JE (1991) Identification of cell membrane proteins that bind visna virus. *J Virol* 65: 6137-6143.
52. Bruett L, Barber SA, Clements JE (2000) Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology* 271: 132-141.
53. Crespo H, Reina R, Glaria I, Ramirez H, Andres Xd, et al. (2011) Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet Res* 42.
54. Hotzel I, Cheevers W (2002) Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. *Virology* 301: 21-31.
55. Petursson G, Andresdottir V, Andresson OS, Georgsson G, Palsson PA, et al. (1992) Lentivirus diseases of sheep and goats: maedi-visna and caprine arthritis-encephalitis. Department for Environment, Food and Rural Affairs.
56. Mselli-Lakhal L, Guiguen F, Fornazero C, Du J, Favier C, et al. (1999) Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology* 259: 67-73.
57. Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Sheffer D, Griffin DE, Clements JE (1983) Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect Immun* 41: 67-73.
58. Gendelman HE, Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Kennedy PG, Ghotbi Z, et al. (1986) Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J Virol* 58: 67-74.
59. Barros SC, Ramos F, Duarte M, Fagulha T, Cruz B, et al. (2004) Genomic characterization of a slow/low maedi visna virus. *Virus Genes* 29: 199-210.
60. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ (1999) *Veterinary virology*: Academic press.
61. Ramirez H, Reina R, Amorena B, de Andres D, Martinez HA (2013) Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses* 5: 1175-1207.
62. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242: 1171-1173.
63. Smyth RP, Davenport MP, Mak J (2012) The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res* 169: 415-429.
64. L'Homme Y, Leboeuf A, Arsenault J, Fras M (2015) Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF). *Virology* 475: 159-171.
65. Vartanian JP, Meyerhans A, Asjo B, Wain-Hobson S (1991) Selection, recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol* 65: 1779-1788.
66. Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Davidson NO, Cho SJ, et al. (2004) Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* 14: 1392-1396.
67. Eigen M (1971) Molecular self-organization and the early stages of evolution. *Experientia* 27: 149-212.

68. Querat G, Barban V, Sauze N, Filippi P, Vigne R, et al. (1984) Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *J Virol* 52: 672-679.
69. Peeters M, Sharp PM (2000) Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* 14 Suppl 3: S129-140.
70. Shah C, Boni J, Huder JB, Vogt HR, Muhlherr J, et al. (2004) Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology* 319: 12-26.
71. Sargan DR, Bennet ID, Cousens C, Roy DJ, Blacklaws BA, et al. (1991) Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 8): 1893-1903.
72. Querat G, Audoly G, Sonigo P, Vigne R (1990) Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology* 175: 434-447.
73. Andresson OS, Elser JE, Tobin GJ, Greenwood JD, Gonda MA, et al. (1993) Nucleotide sequence and biological properties of a pathogenic proviral molecular clone of neurovirulent visna virus. *Virology* 193: 89-105.
74. Karr BM, Chebloune Y, Leung K, Narayan O (1996) Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology* 225: 1-10.
75. Cardinaux L, Zahno ML, Reina R, Bertoni G. (2014) Exploring the molecular correlates of attenuation using a clone of Small Ruminant Lentiviruses generated from a field isolate. 5th Swiss Virology Meeting.
76. Saltarelli M, Querat G, Konings DA, Vigne R, Clements JE (1990) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179: 347-364.
77. Grego E, Profiti M, Giammarioli M, Giannino L, Rutili D, et al. (2002) Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 828-832.
78. Juganaru M, Reina R, Bertolotti L, Stella MC, Profiti M, et al. (2011) In vitro properties of small ruminant lentivirus genotype E. *Virology* 410: 88-95.
79. Bertolotti L, Mazzei M, Puggioni G, Carrozza ML, Dei Giudici S, et al. (2011) Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. *J Gen Virol* 92: 1923-1929.
80. Gjerset B, Storset AK, Rimstad E (2006) Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J Gen Virol* 87: 573-580.
81. Reina R, Grego E, Bertolotti L, De Meneghi D, Rosati S (2009) Genome Analysis of Small-Ruminant Lentivirus Genotype E: a Caprine Lentivirus with Natural Deletions of the dUTPase Subunit, vpr-Like Accessory Gene, and 70-Base-Pair Repeat of the U3 Region. *J Virol* 83: 1152-1155.
82. Reina R, Bertolotti L, Giudici SD, Puggioni G, Ponti N, et al. (2010) Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Veterinary Microbiology* 144: 24-31.
83. Juganaru M, Reina R, Grego E, Profiti M, Rosati S (2010) LTR promoter activity of SRLV genotype E, strain Roccaverano. *Veterinary Research Communications* 34: S47-S51.
84. Banks KL, Adams DS, McGuire TC, Carlson J (1983) Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *Am J Vet Res* 44: 2307-2311.
85. Oliver R, Cathcart A, McNiven R, Poole W, Robati G (1984) Transmission of caprine arthritis encephalitis virus to sheep. *N Z Vet J* 32: 199-200.
86. Dickson J, Ellis T (1989) Experimental caprine retrovirus infection in sheep. *Vet Rec* 125: 649.
87. Leroux C, Chastang J, Greenland T, Mornex JF (1997) Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* 142: 1125-1137.
88. Pisoni G, Quasso A, Moroni P (2005) Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339: 147-152.

89. Minardi da Cruz JC, Singh DK, Lamara A, Chebloune Y (2013) Small ruminant lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range. *Viruses* 5: 1867-1884.
90. Mselli-Lakhal L, Favier C, Leung K, Guiguen F, Grezel D, et al. (2000) Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. *J Virol* 74: 8343-8348.
91. Bruett L, Clements JE (2001) Functional murine leukemia virus vectors pseudotyped with the visna virus envelope show expanded visna virus cell tropism. *J Virol* 75: 11464-11473.
92. Hotzel I, Cheevers WP (2001) Host range of small-ruminant lentivirus cytopathic variants determined with a selectable caprine arthritis-encephalitis virus pseudotype system. *J Virol* 75: 7384-7391.
93. Lyall JW, Solanky N, Tiley LS (2000) Restricted species tropism of maedi-visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *J Gen Virol* 81: 2919-2927.
94. Bieniasz PD (2012) An overview of intracellular interactions between immunodeficiency viruses and their hosts. *AIDS* 26: 1243-1254.
95. Jauregui P, Crespo H, Glaria I, Lujan L, Contreras A, et al. (2012) Ovine TRIM5alpha can restrict visna/maedi virus. *J Virol* 86: 9504-9509.
96. Morin T, Guiguen F, Bouzar BA, Villet S, Greenland T, et al. (2003) Clearance of a productive lentivirus infection in calves experimentally inoculated with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol* 77: 6430-6437.
97. Chebloune Y, Sheffer D, Karr BM, Stephens E, Narayan O (1996) Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* 222: 21-30.
98. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, et al. (2008) The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3: 245-252.
99. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451: 425-430.
100. Oskarsson T, Hreggvidsdottir HS, Agnarsdottir G, Matthiasdottir S, Ogmundsdottir MH, et al. (2007) Duplicated sequence motif in the long terminal repeat of maedi-visna virus extends cell tropism and is associated with neurovirulence. *J Virol* 81: 4052-4057.
101. Gomez-Lucia E, Rowe J, Collar C, Murphy B (2013) Diversity of caprine arthritis-encephalitis virus promoters isolated from goat milk and passaged in vitro. *Vet J* 196: 431-438.
102. Agnarsdottir G, Thorsteinsdottir H, Oskarsson T, Matthiasdottir S, Hafliadottir BS, et al. (2000) The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 81: 1901-1905.
103. Andresdottir V, Tang X, Agnarsdottir G, Andresson OS, Georgsson G, et al. (1998) Biological and genetic differences between lung- and brain-derived isolates of maedi-visna virus. *Virus Genes* 16: 281-293.
104. Angelopoulou K, Poutahidis T, Brellou GD, Greenland T, Vlemmas I (2008) A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. *Vet J* 175: 346-355.
105. Gomez-Lucia E, Sanjosé L, Crespo O, Reina R, Glaria I, et al. (2014) Modulation of the long terminal repeat promoter activity of small ruminant lentiviruses by steroids. *Vet J*.
106. 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: 177-184.
107. Adedeji AO, Barr B, Gomez-Lucia E, Murphy B (2013) A polytropic caprine arthritis encephalitis virus promoter isolated from multiple tissues from a sheep with multisystemic lentivirus-associated inflammatory disease. *Viruses* 5: 2005-2018.
108. Hotzel I, Kumpula-McWhirter N, Cheevers WP (2002) Rapid evolution of two discrete regions of the caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface glycoprotein during persistent infection. *Virus Res* 84: 17-25.
109. Blackard JT (2012) HIV compartmentalization: a review on a clinically important phenomenon. *Curr HIV Res* 10: 133-142.

110. Liu P, Hudson LC, Tompkins MB, Vahlenkamp TW, Meeker RB (2006) Compartmentalization and evolution of feline immunodeficiency virus between the central nervous system and periphery following intracerebroventricular or systemic inoculation. *J Neurovirol* 12: 307-321.
111. Narayan O, Wolinsky JS, Clements JE, Strandberg JD, Griffin DE, et al. (1982) Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. *J Gen Virol* 59: 345-356.
112. Ryan S, Tiley L, McConnell I, Blacklaws B (2000) Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *J Virol* 74: 10096-10103.
113. Guiguen F, Asso J (1990) Inhibition of CAEV expression in goats experimentally and naturally infected. *Dev Biol Stand* 72: 235-239.
114. Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei KJ, et al. (2007) Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* 110: 393-400.
115. Peluso R, Haase A, Stowring L, Edwards M, Ventura P (1985) A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* 147: 231-236.
116. Sigurdardottir B, Thormar H (1964) Isolation of a Viral Agent from the Lungs of Sheep Affected with Maedi. *J Infect Dis* 114: 55-60.
117. Dahlberg JE, Gaskin JM, Perk K (1981) Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J Virol* 39: 914-919.
118. Peterson K, Brinkhof J, Houwers DJ, Colenbrander B, Gadella BM (2008) Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 69: 433-442.
119. Stowring L, Haase AT, Petursson G, Georgsson G, Palsson P, et al. (1985) Detection of visna virus antigens and RNA in glial cells in foci of demyelination. *Virology* 141: 311-318.
120. Georgsson G, Houwers DJ, Palsson PA, Petursson G (1989) Expression of viral antigens in the central nervous system of visna-infected sheep: an immunohistochemical study on experimental visna induced by virus strains of increased neurovirulence. *Acta Neuropathol* 77: 299-306.
121. Baszler TV, Harwood WG, Lester KL, Davis WC, Knowles DP (1994) Characterization of caprine microglial cells and in vitro infection with caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *Lab Invest* 70: 933-943.
122. Adebayo IA, Olaleye OD, Awoniyi TA (2010) Affinity (tropism) of caprine arthritis encephalitis virus for brain cells. *Afr J Med Med Sci* 39 Suppl: 89-93.
123. Kirkland PD, Batty EM (1987) Caprine arthritis-encephalitis virus: an efficient method for the large scale production of serological antigens. *J Virol Methods* 16: 323-326.
124. Belov L, Whalley JM (1988) Virus-specific polypeptides of caprine arthritis-encephalitis virus recognized by monoclonal antibodies to virion proteins p24 and p14. *J Gen Virol* 69 (Pt 5): 1097-1103.
125. Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhall L, Tainturier D, Chebloune Y (2001) Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res* 79: 165-172.
126. Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhall L, Tainturier D, Chebloune Y (2002) Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Res* 87: 69-77.
127. Milhau N, Bellaton C, Balleydier S, Gaonach M, Le Jan C (2003) In vitro infection of aortic endothelial cells by caprine arthritis encephalitis virus enhances in vitro transmigration of peripheral blood leukocytes and modulates their phenotypic expression. *Vet Res* 34: 273-284.
128. Lechat E, Milhau N, Brun P, Bellaton C, Greenland T, et al. (2005) Goat endothelial cells may be infected in vitro by transmigration of caprine arthritis-encephalitis virus-infected leucocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 104: 257-263.
129. Capucchio MT, Sanna E, Sanna MP, Farigu S, Minelli R, et al. (2003) Maedi-visna virus detection in ovine third eyelids. *J Comp Pathol* 129: 37-43.
130. Grossi P, Giudice C, Bertolotti I, Cioccarelli G, Brocchi E, et al. (2005) Immunohistochemical detection of the p27 capsid protein of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in bone-marrow cells of seropositive goats. *J Comp Pathol* 133: 197-200.
131. Angelopoulou K, Brellou GD, Vlemmas I (2006) Detection of maedi-visna virus in the kidneys of naturally infected sheep. *J Comp Pathol* 134: 329-335.

132. Brellou GD, Angelopoulou K, Poutahidis T, Vlemmas I (2007) Detection of maedi-visna virus in the liver and heart of naturally infected sheep. *J Comp Pathol* 136: 27-35.
133. Da Silva Teixeira MF, Lambert V, Mselli-Lakahl L, Chettab A, Chebloune Y, et al. (1997) Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *Am J Vet Res* 58: 579-584.
134. Mselli-Lakhal L, Guiguen F, Fornazero C, Favier C, Durand J, et al. (2001) Immortalized goat milk epithelial cell lines replicate CAEV at high level. *Vet Res* 32: 429-440.
135. Olivier M, Berthon P, Chastang J, Cordier G, Lantier F (2001) Establishment and characterisation of ovine blood monocyte-derived cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* 82: 139-151.
136. Singh DK, Chebloune Y, Mselli-Lakhal L, Karr BM, Narayan O (1999) Ovine lentivirus-infected macrophages mediate productive infection in cell types that are not susceptible to infection with cell-free virus. *J Gen Virol* 80 (Pt 6): 1437-1444.
137. Sihvonen L, Veijalainen P (1981) Kinetics of maedi virus production in sheep choroid plexus cells. *Veterinary Microbiology* 6: 1-8.
138. Crespo H, Jauregui P, Glaria I, Sanjose L, Polledo L, et al. (2012) Mannose receptor may be involved in small ruminant lentivirus pathogenesis. *Vet Res* 43.
139. Palsson PA (1978) Maedi/Visna, a slow virus disease. *Bull Off int Epiz* 89: 465-475.
140. Houwers DJ (1990) Economic importance, epidemiology and control. *Maedi-visna and related diseases* Edited by G P, tursson and R Hoff-Jorgensen Kluwer Academic Publishers Boston: 83-117.
141. Nagel-Alne GE, Asheim LJ, Hardaker JB, Sølverød L, Lindheim D, et al. (2014) The Norwegian Healthier Goats programme—A financial cost–benefit analysis. *Preventive veterinary medicine* 114: 96-105.
142. Houwers DJ, Schaake J, Jr., de Boer GF (1984) Maedi-visna control in sheep II. Half-yearly serological testing with culling of positive ewes and progeny. *Vet Microbiol* 9: 445-451.
143. Cutlip RC, Lehmkühl HD (1986) Eradication of ovine progressive pneumonia from sheep flocks. *J Am Vet Med Assoc* 188: 1026-1027.
144. Ferrer L (1996) Control del Maedi-Visna en explotaciones ovinas extensivas con elevada seroprevalencia. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.
145. Berriatua E, Alvarez V, Extramiana B, Gonzalez L, Daltabuit M, et al. (2003) Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Prev Vet Med* 60: 265-279.
146. Larruskain A, Bernales I, Lujan L, de Andres D, Amorena B, et al. (2013) Expression analysis of 13 ovine immune response candidate genes in Visna/Maedi disease progression. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36: 405-413.
147. White SN, Knowles DP (2013) Expanding possibilities for intervention against small ruminant lentiviruses through genetic marker-assisted selective breeding. *Viruses* 5: 1466-1499.
148. Ritchie C, Hosie B (2014) Concern over maedi visna breakdowns. *Vet Rec* 175: 50-51.
149. Reports Na (2014) Animal health: Concern about 'out of sight, out of mind' attitude to maedi visna *Veterinary Record* 174: 645
150. Reina R, Barbezange C, Niesalla H, de Andres X, Arnarson H, et al. (2008) Mucosal immunization against ovine lentivirus using PEI-DNA complexes and modified vaccinia Ankara encoding the gag and/or env genes. *Vaccine* 26: 4494-4505.
151. de Andres X, Reina R, Ciriza J, Crespo H, Glaria I, et al. (2009) Use of B7 costimulatory molecules as adjuvants in a prime-boost vaccination against Visna/Maedi ovine lentivirus. *Vaccine* 27: 4591-4600.
152. Niesalla H, de Andres X, Barbezange C, Fraisier C, Reina R, et al. (2009) Systemic DNA immunization against ovine lentivirus using particle-mediated epidermal delivery and modified vaccinia Ankara encoding the gag and/or env genes. *Vaccine* 27: 260-269.
153. Reina R, Mora MI, Glaria I, Garcia I, Solano C, et al. (2006) Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res* 121: 189-198.
154. Bertolotti L, Reina R, Mazzei M, Prezioso S, Camero M, et al. (2013) Small ruminant lentivirus genotype B and E interaction: evidences on the role of Roccaverano strain on reducing proviral load of the challenging CAEV strain. *Vet Microbiol* 163: 33-41.

155. Mikula I, Bhide M, Pastorekova S, Mikula I (2010) Characterization of ovine TLR7 and TLR8 protein coding regions, detection of mutations and Maedi Visna virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 138: 51-59.
156. White SN, Mousel MR, Reynolds JO, Lewis GS, Herrmann-Hoesing LM (2009) Common promoter deletion is associated with 3.9-fold differential transcription of ovine CCR5 and reduced proviral level of ovine progressive pneumonia virus. *Anim Genet* 40: 583-589.
157. Fluri A, Nenci C, Zahno ML, Vogt HR, Charan S, et al. (2006) The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T- and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. *Vaccine* 24: 597-606.
158. Heaton MP, Clawson ML, Chitko-Mckown CG, Leymaster KA, Smith TP, et al. (2012) Reduced lentivirus susceptibility in sheep with TMEM154 mutations. *PLoS Genet* 8: e1002467.
159. White SN, Mousel MR, Herrmann-Hoesing LM, Reynolds JO, Leymaster KA, et al. (2012) Genome-wide association identifies multiple genomic regions associated with susceptibility to and control of ovine lentivirus. *PLoS One* 7: e47829.
160. Sider LH, Heaton MP, Chitko-McKown CG, Harhay GP, Smith TP, et al. (2013) Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes. *Vet Res* 44: 64.
161. Stonos N, Wootton SK, Karrow N (2014) Immunogenetics of small ruminant lentiviral infections. *Viruses* 6: 3311-3333.
162. de Andres D, Klein D, Watt NJ, Berriatua E, Torsteinsdottir S, et al. (2005) Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* 107: 49-62.
163. Knowles DP, Jr. (1997) Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13: 1-11.
164. Herrmann-Hoesing LM (2010) Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J Vet Diagn Invest* 22: 843-855.
165. Knowles DP, Evermann J.F., Shropshire C., VandreSchalie J., Bradway D., Gezon H.M., and Cheevers W.P. (1994) Evaluation of Agar Gel Immunodiffusion Serology Using Caprine and Ovine Lentiviral Antigens for Detection of Antibody to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 243-245.
166. Syngé BA, Ritchie CM (2010) Elimination of small ruminant lentivirus infection from sheep flocks and goat herds aided by health schemes in Great Britain. *Vet Rec* 167: 739-743.
167. Gogolewski RP, Adams DS, McGuire TC, Banks KL, Cheevers WP (1985) Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J Gen Virol* 66 (Pt 6): 1233-1240.
168. Reina R, Grego E, Profiti M, Glaria I, Robino P, et al. (2009) Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Veterinary Microbiology* 138: 251-257.
169. Lacerenza D, Giammarioli M, Grego E, Marini C, Profiti M, et al. (2006) Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 112: 264-271.
170. de Andres X, Ramirez H, Bertolotti L, San Roman B, Glaria I, et al. (2013) An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152: 277-288.
171. Cardinaux L, Zahno ML, Deubelbeiss M, Zanoni R, Vogt HR, et al. (2013) Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Vet Microbiol* 162: 572-581.
172. Brinkhof J, van Maanen C (2007) Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1210-1214.
173. Toft N, Akerstedt J, Tharaldsen J, Hopp P (2007) Evaluation of three serological tests for diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Vet Microbiol* 120: 77-86.
174. Ramirez H, San Roman B, Glaria I, Reina R, Hernandez MM, et al. (2009) Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology* 72: 1085-1096.
175. Herrmann LM, Cheevers WP, McGuire TC, Adams DS, Hutton MM, et al. (2003) Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 267-271.

176. Zanoni RG, Vogt HR, Pohl B, Bottcher J, Bommeli W, et al. (1994) An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *Zentralbl Veterinarmed B* 41: 662-669.
177. Saman E, Van Eynde G, Lujan L, Extramiana B, Harkiss G, et al. (1999) A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 734-740.
178. Mordasini F, Vogt HR, Zahno ML, Maeschli A, Nenci C, et al. (2006) Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *J Clin Microbiol* 44: 981-991.
179. Olech M, Rachid A, Croise B, Kuzmak J, Valas S (2012) Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Res* 163: 528-536.
180. Brinkhof JMA, Houwers DJ, van Maanen C (2007) Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infections using the ELITEST-MVV ELISA. *Small Ruminant Research* 70: 194-199.
181. Brinkhof JM, Houwers DJ, Moll L, Dercksen D, van Maanen C (2010) Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet Microbiol* 142: 193-198.
182. Motha MX, Ralston JC (1994) Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Vet Microbiol* 38: 359-367.
183. Plaza M, Sánchez A, Corrales JC, De la Fe C, Contreras A (2009) Caprine arthritis encephalitis virus diagnosed by ELISA in lactating goats using milk samples. *Small Ruminant Research* 81: 189-192.
184. Reina R, Glaria I, Cianca S, Crespo H, de Andres X, et al. (2011) Use of small ruminant lentivirus-infected rams for artificial insemination. *Veterinary Journal* 189: 106-107.
185. Lujan L, Begara I, Collie DDS, Watt NJ (1994) Ovine lentivirus (maedi-visna virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. *Veterinary Pathology* 31: 695-703.
186. Biescas E, Preziuso S, Bulgin M, DeMartini JC (2005) Ovine lentivirus-associated leucomyelitis in naturally infected North American sheep. *J Comp Pathol* 132: 107-116.
187. Storset AK, Teig A, Rimstad E (1996) Detection of caprine arthritis-encephalitis virus RNA in macrophages by in situ hybridization using fluorescein-labelled single-stranded RNA probes. *Vet Microbiol* 52: 25-35.
188. Reina R, Berriatua E, Lujan L, Juste R, Sanchez A, et al. (2008) Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *Vet J*.
189. Germain K, Valas S (2006) Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. *Virus Res*.
190. Huang J, Sun Y, Liu Y, Xiao H, Zhuang S (2012) Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA. *Arch Virol* 157: 1463-1469.
191. Barlough J, East N, Rowe JD, Vanhoosear K, Derock E, et al. (1994) Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *Journal of Virological Methods* 50: 101-113.
192. Leroux C, Lerondelle C, Chastang J, Mornex JF (1997) RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet Res* 28: 115-121.
193. Extramiana B, González L, Cortabarría, N., García, M., Juste, RA. (2002) Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Rum Res* 44: 109-117.
194. Travassos CE, Benoît C, Valas S, da Silva AG, Perrin G (1999) Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research* 32: 101-106.
195. Reddy PG, Sapp WJ, Heneine W (1993) Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31: 3042-3043.
196. Brodie SJ, Pearson LD, Snowden GD, DeMartini JC (1992) Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Arch Virol* 130: 413-428.

197. Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, DeRock E, et al. (1993) Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res* 54: 1858-1862.
198. Zaroni RG, Cordano P, Nauta IM, Peterhans E (1996) PCR for the detection of lentiviruses from small ruminants. *Schweiz Arch Tierheilkd* 138: 93-98.
199. Alvarez V, Daltabuit-Test M, Arranz J, Leginagoikoa I, Juste RA, et al. (2006) PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res Vet Sci* 80: 226-234.
200. Leginagoikoa I, Minguíjon E, Berriatua E, Juste RA (2009) Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *J Virol Methods* 156: 145-149.
201. Celer V, Jr., Celer V, Nejedla E, Bertoni G, Peterhans E, et al. (2000) The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech Maedi-Visna isolates based on gag gene sequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 203-215.
202. Eltahir YM, Dovas CI, Papanastassopoulou M, Koumbati M, Giadinis N, et al. (2006) Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *J Virol Methods* 135: 240-246.
203. Dolfini T, Conrad L, Flores I, Ravazzolo A (2015) Comparison of primer pairs: Greater degeneracy improves small ruminant lentivirus (SRLVs) detection by seminested PCR. *Small Ruminant Research* 123: 189-192.
204. Rosati S, Kwang J, Keen JE (1995) Genome analysis of North American small ruminant lentiviruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Vet Diagn Invest* 7: 437-443.
205. Zaroni R, Pauli U, Peterhans E (1990) Detection of caprine arthritis-encephalitis- and maedi-visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia* 46: 316-319.
206. Zaroni RG, Nauta IM, Kuhnert P, Pauli U, Pohl B, et al. (1992) Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet Microbiol* 33: 341-351.
207. Herrmann-Hoesing LM, White SN, Lewis GS, Mousel MR, Knowles DP (2007) Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1274-1278.
208. Brinkhof JM, van Maanen C, Wigger R, Peterson K, Houwers DJ (2008) Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 147: 338-344.
209. Carrozza ML, Mazzei M, Bandecchi P, Fraiser C, Perez M, et al. (2010) Development and comparison of strain specific gag and pol real-time PCR assays for the detection of Visna/maedi virus. *J Virol Methods* 165: 161-167.
210. Zhang Z, Watt NJ, Hopkins J, Harkiss G, Woodall CJ (2000) Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J Virol Methods* 86: 13-20.
211. Gudmundsson B, Bjarnadottir H, Kristjansdottir S, Jonsson JJ (2003) Quantitative assays for maedi-visna virus genetic sequences and mRNA's based on RT-PCR with real-time FRET measurements. *Virology* 307: 135-142.
212. Kuhar U, Barlic-Maganja D, Grom J (2013) Development and validation of TaqMan probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small ruminant lentivirus strains. *BMC Vet Res* 9: 172.
213. Brajon G, Mandas D, Liciardi M, Taccori F, Meloni M, et al. (2012) Development and Field Testing of a Real-Time PCR Assay for Caprine Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV). *Open Virol J* 6: 82-90.
214. Valas S, Benoit C, Guionaud C, Perrin G, Mamoun RZ (1997) North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology* 237: 307-318.
215. Muz D, Oguzoglu TC, Rosati S, Reina R, Bertolotti L, et al. (2013) First molecular characterization of visna/maedi viruses from naturally infected sheep in Turkey. *Archives of Virology* 158: 559-570.
216. Modolo JR, Stachissini AVM, Padovani CR, Araujo Júnior JP, Castro RS, et al. (2009) PCR associated with agar gel immunodiffusion assay improve caprine arthritis-encephalitis (CAEV) control. *Small Ruminant Research* 81: 18-20.

217. Brinkhof JMA, Moll L, van Maanen C, Houwers DJ (2010) Use of serology and polymerase chain reaction for the rapid eradication of small ruminant lentivirus infections from a sheep flock: A case report. *Research in Veterinary Science* 88: 41-43.
218. Blacklaws BA, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Watt NJ, de Andres D, et al. (2004) Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* 101: 199-208.
219. Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Martignat L, Chatagnon G, Baril G, et al. (2005) Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology* 64: 1656-1666.
220. Fieni F, Pellerin JL, Roux C, Poulin N, Baril G, et al. (2012) Can caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) be transmitted by in vitro fertilization with experimentally infected sperm? *Theriogenology* 77: 644-651.
221. Begara I, Lujan L, Collie DD, Miller HR, Watt NJ (1996) Early pulmonary cell response during experimental maedi-visna virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 55: 115-126.
222. Pepin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E (1998) Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res* 29: 341-367.
223. Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Schmerr MJ, Brogden KA (1988) Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Vet Microbiol* 17: 237-250.
224. Perry LL, Wilkerson MJ, Hullinger GA, Cheevers WP (1995) Depressed CD4+ T lymphocyte proliferative response and enhanced antibody response to viral antigen in chronic lentivirus-induced arthritis. *J Infect Dis* 171: 328-334.
225. Pyrah IT, Watt NJ (1996) Immunohistological study of the depressed cutaneous DTH response in sheep naturally infected with an ovine lentivirus (Maedi-Visna virus). *Clin Exp Immunol* 104: 32-36.
226. Blacklaws BA (2012) Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35: 259-269.
227. Thormar H (2013) The origin of lentivirus research: Maedi-visna virus. *Curr HIV Res* 11: 2-9.
228. Cutlip RC, Jackson TA, Lehmkuhl HD (1979) Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis. *Am J Vet Res* 40: 1370-1374.
229. Watt NJ, MacIntyre N, Collie D, Sargan D, McConnell I (1992) Phenotypic analysis of lymphocyte populations in the lungs and regional lymphoid tissue of sheep naturally infected with maedi visna virus. *Clin Exp Immunol* 90: 204-208.
230. van der Molen EJ, Vecht U, Houwers DJ (1985) A chronic indurative mastitis in sheep, associated with maedi/visna virus infection. *Vet Q* 7: 112-119.
231. Lujan L, Garcia Marin JF, Fernandez de Luco D, Vargas A, Badiola JJ (1991) Pathological changes in the lungs and mammary glands of sheep and their relationship with maedi-visna infection. *Vet Rec* 129: 51-54.
232. Bolea R, Monleon E, Carrasco L, Vargas A, de Andres D, et al. (2006) Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Vet Res* 37: 133-144.
233. Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Wood RL, Brogden KA (1985) Arthritis associated with ovine progressive pneumonia. *Am J Vet Res* 46: 65-68.
234. Narayan O, Cork LC (1985) Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev Infect Dis* 7: 89-98.
235. Watt NJ, King TJ, Collie D, McIntyre N, Sargan D, et al. (1992) Clinicopathological investigation of primary, uncomplicated maedi-visna virus infection. *Vet Rec* 131: 455-461.
236. Wilkerson MJ, Davis WC, Baszler TV, Cheevers WP (1995) Immunopathology of chronic lentivirus-induced arthritis. *Am J Pathol* 146: 1433-1443.
237. Wilkerson MJ, Davis WC, Cheevers WP (1995) Peripheral blood and synovial fluid mononuclear cell phenotypes in lentivirus induced arthritis. *J Rheumatol* 22: 8-15.
238. Knowles D, Jr., Cheevers W, McGuire T, Stem T, Gorham J (1990) Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol* 64: 2396-2398.
239. Craig LE, Sheffer D, Meyer AL, Hauer D, Lechner F, et al. (1997) Pathogenesis of ovine lentiviral encephalitis: derivation of a neurovirulent strain by in vivo passage. *J Neurovirol* 3: 417-427.

240. Polledo L, Gonzalez J, Benavides J, Martinez-Fernandez B, Ferreras MC, et al. (2012) Perivascular inflammatory cells in ovine Visna/maedi encephalitis and their possible role in virus infection and lesion progression. *J Neurovirol* 18: 532-537.
241. Pálsson PA (1990) Maedi-Visna. History and Clinical Description. In: Pétursson G, Hoff-Jørgensen R, editors. *Maedi-Visna and Related Diseases*: Springer US. pp. 3-17.
242. Sigurdsson B, Pálsson P, Grimsson H (1957) Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J Neuropathol Exp Neurol* 16: 389-403.
243. Constable PD, Meier WA, Foley GL, Morin D, Cutlip RC, et al. (1996) Visna-like disease in a ram with chronic demyelinating encephalomyelitis. *J Am Vet Med Assoc* 208: 117-120.
244. Rensang AA, Stam FC, De Boer GF (1966) A Meningo-Leucoencephalomyelitis Resembling Visna in Dutch Zwoeger Sheep. *Pathologia Veterinaria Online* 3: 401-411.
245. Watt NJ, Roy DJ, McConnell I, King TJ (1990) A case of visna in the United Kingdom. *Vet Rec* 126: 600-601.
246. Benavides J, Fuertes M, Garcia-Pariente C, Ferreras MC, Garcia Marin JF, et al. (2006) Natural cases of visna in sheep with myelitis as the sole lesion in the central nervous system. *J Comp Pathol* 134: 219-230.
247. Benavides J, Garcia-Pariente C, Carmen Ferreras M, Fuertes M, Francisco Garcia-Marin J, et al. (2006) Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4- and 6-month-old lambs. *Vet J*.
248. Pinckowsky P, Gimeno M, Pérez M, Insausti N, Morenao B, et al. Medullar visna by 697 strain in sheep: wider distribution than previously thought; 2012.
249. Benavides J, Garcia-Pariente C, Fuertes M, Ferreras MC, Garcia-Marin JF, et al. (2009) Maedi-visna: the meningoencephalitis in naturally occurring cases. *J Comp Pathol* 140: 1-11.
250. Polledo L, Gonzalez J, Benavides J, Morales S, Martinez-Fernandez B, et al. (2012) Patterns of Lesion and Local Host Cellular Immune Response in Natural Cases of Ovine Maedi-Visna. *Journal of Comparative Pathology* 147: 1-10.
251. Torsteinsdottir S, Agnarsdottir G, Matthiasdottir S, Rafnar B, Andresdottir V, et al. (1997) In vivo and in vitro infection with two different molecular clones of visna virus. *Virology* 229: 370-380.
252. Bieniasz PD (2004) Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 5: 1109-1115.
253. Blanco-Melo D, Venkatesh S, Bieniasz PD (2012) Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses. *Immunity* 37: 399-411.
254. Pichlmair A, Reis e Sousa C (2007) Innate recognition of viruses. *Immunity* 27: 370-383.
255. Cowan S, Hatzioannou T, Cunningham T, Muesing MA, Gottlinger HG, et al. (2002) Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11914-11919.
256. Hatzioannou T, Cowan S, Goff SP, Bieniasz PD, Towers GJ (2003) Restriction of multiple divergent retroviruses by Lv1 and Ref1. *EMBO J* 22: 385-394.
257. Bieniasz PD (2003) Restriction factors: a defense against retroviral infection. *Trends Microbiol* 11: 286-291.
258. Towers G, Bock M, Martin S, Takeuchi Y, Stoye JP, et al. (2000) A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12295-12299.
259. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, et al. (2004) The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427: 848-853.
260. Hatzioannou T, Perez-Caballero D, Yang A, Cowan S, Bieniasz PD (2004) Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10774-10779.
261. Keckesova Z, Ylisen LM, Towers GJ (2004) The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10780-10785.
262. Si Z, Vandegraaff N, O'Huigin C, Song B, Yuan W, et al. (2006) Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7454-7459.

263. Schaller T, Hue S, Towers GJ (2007) An active TRIM5 protein in rabbits indicates a common antiviral ancestor for mammalian TRIM5 proteins. *J Virol* 81: 11713-11721.
264. Fletcher AJ, Hue S, Schaller T, Pillay D, Towers GJ (2010) Hare TRIM5alpha restricts divergent retroviruses and exhibits significant sequence variation from closely related lagomorpha TRIM5 genes. *J Virol* 84: 12463-12468.
265. Sewram S, Singh R, Kormuth E, Werner L, Mlisana K, et al. (2009) Human TRIM5alpha expression levels and reduced susceptibility to HIV-1 infection. *J Infect Dis* 199: 1657-1663.
266. Towers GJ (2005) Control of viral infectivity by tripartite motif proteins. *Hum Gene Ther* 16: 1125-1132.
267. Nisole S, Stoye JP, Saib A (2005) TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3: 799-808.
268. Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, et al. (2006) Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5514-5519.
269. Song B, Gold B, O'Huigin C, Javanbakht H, Li X, et al. (2005) The B30.2(SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5alpha exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates. *J Virol* 79: 6111-6121.
270. Ganser-Pornillos BK, Chandrasekaran V, Pornillos O, Sodroski JG, Sundquist WI, et al. (2011) Hexagonal assembly of a restricting TRIM5alpha protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 534-539.
271. Ohkura S, Yap MW, Sheldon T, Stoye JP (2006) All Three Variable Regions of the TRIM5 α B30.2 Domain Can Contribute to the Specificity of Retrovirus Restriction. *J Virol* 80: 8554-8565.
272. Stremlau M, Perron M, Welikala S, Sodroski J (2005) Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. *J Virol* 79: 3139-3145.
273. Sakuma R, Ohmine S, Ikeda Y (2010) Determinants for the rhesus monkey TRIM5alpha-mediated block of the late phase of HIV-1 replication. *J Biol Chem* 285: 3784-3793.
274. Ohmine S, Sakuma R, Sakuma T, Thatava T, Takeuchi H, et al. (2011) The antiviral spectra of TRIM5alpha orthologues and human TRIM family proteins against lentiviral production. *PLoS One* 6: e16121.
275. Towers GJ (2007) The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology* 4: 40.
276. Strebel K, Klimkait T, Martin MA (1988) A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 241: 1221-1223.
277. Geraghty RJ, Talbot KJ, Callahan M, Harper W, Panganiban AT (1994) Cell type-dependence for Vpu function. *J Med Primatol* 23: 146-150.
278. Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD (2006) HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2: e39.
279. Neil SJ, Sandrin V, Sundquist WI, Bieniasz PD (2007) An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host Microbe* 2: 193-203.
280. Gupta RK, Hue S, Schaller T, Verschoor E, Pillay D, et al. (2009) Mutation of a single residue renders human tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion. *PLoS Pathog* 5: e1000443.
281. McNatt MW, Zang T, Hatzioannou T, Bartlett M, Fofana IB, et al. (2009) Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. *PLoS Pathog* 5: e1000300.
282. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, et al. (2009) Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 139: 499-511.
283. Venkatesh S, Bieniasz PD (2013) Mechanism of HIV-1 virion entrapment by tetherin. *PLoS Pathog* 9: e1003483.
284. Evans DT, Serra-Moreno R, Singh RK, Guatelli JC (2010) BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends Microbiol* 18: 388-396.
285. Jouvenet N, Neil SJ, Zhadina M, Zang T, Kratovac Z, et al. (2009) Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *J Virol* 83: 1837-1844.

286. Sakuma T, Noda T, Urata S, Kawaoka Y, Yasuda J (2009) Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. *J Virol* 83: 2382-2385.
287. Zhang F, Wilson SJ, Landford WC, Virgen B, Gregory D, et al. (2009) Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists. *Cell Host Microbe* 6: 54-67.
288. Le Tortorec A, Neil SJ (2009) Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. *J Virol* 83: 11966-11978.
289. Jia B, Serra-Moreno R, Neidermyer W, Rahmberg A, Mackey J, et al. (2009) Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2. *PLoS Pathog* 5: e1000429.
290. Smith HC, Bennett RP, Kizilyer A, McDougall WM, Prohaska KM (2012) Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Semin Cell Dev Biol* 23: 258-268.
291. LaRue RS, Jonsson SR, Silverstein KA, Lajoie M, Bertrand D, et al. (2008) The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol Biol* 9: 104.
292. Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, et al. (2002) An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79: 285-296.
293. Kouno T, Luengas EM, Shigematsu M, Shandilya SM, Zhang J, et al. (2015) Structure of the Vif-binding domain of the antiviral enzyme APOBEC3G. *Nature structural & molecular biology*.
294. Simon JH, Gaddis NC, Fouchier RA, Malim MH (1998) Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med* 4: 1397-1400.
295. Refsland EW, Stenglein MD, Shindo K, Albin JS, Brown WL, et al. (2010) Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res* 38: 4274-4284.
296. Mussil B, Sauermaun U, Motzkus D, Stahl-Hennig C, Sopper S (2011) Increased APOBEC3G and APOBEC3F expression is associated with low viral load and prolonged survival in simian immunodeficiency virus infected rhesus monkeys. *Retrovirology* 8: 77.
297. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, et al. (2003) Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424: 99-103.
298. Jin X, Brooks A, Chen H, Bennett R, Reichman R, et al. (2005) APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. *J Virol* 79: 11513-11516.
299. Biasin M, Piacentini L, Lo Caputo S, Kanari Y, Magri G, et al. (2007) Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J Infect Dis* 195: 960-964.
300. Vazquez-Perez JA, Ormsby CE, Hernandez-Juan R, Torres KJ, Reyes-Teran G (2009) APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology* 6: 23.
301. Nitta T, Lee S, Ha D, Arias M, Kozak CA, et al. (2012) Moloney murine leukemia virus glyco-gag facilitates xenotropic murine leukemia virus-related virus replication through human APOBEC3-independent mechanisms. *Retrovirology* 9: 58.
302. Okeoma CM, Lovsin N, Peterlin BM, Ross SR (2007) APOBEC3 inhibits mouse mammary tumour virus replication in vivo. *Nature* 445: 927-930.
303. Wiegand HL, Cullen BR (2007) Inhibition of alpharetrovirus replication by a range of human APOBEC3 proteins. *J Virol* 81: 13694-13699.
304. Mahieux R, Suspene R, Delebecque F, Henry M, Schwartz O, et al. (2005) Extensive editing of a small fraction of human T-cell leukemia virus type 1 genomes by four APOBEC3 cytidine deaminases. *J Gen Virol* 86: 2489-2494.
305. Delebecque F, Suspene R, Calattini S, Casartelli N, Saib A, et al. (2006) Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* 80: 605-614.
306. Turelli P, Mangeat B, Jost S, Vianin S, Trono D (2004) Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 303: 1829.
307. Janahi EM, McGarvey MJ (2013) The inhibition of hepatitis B virus by APOBEC cytidine deaminases. *J Viral Hepat* 20: 821-828.
308. Narvaiza I, Linfesty DC, Greener BN, Hakata Y, Pintel DJ, et al. (2009) Deaminase-independent inhibition of parvoviruses by the APOBEC3A cytidine deaminase. *PLoS Pathog* 5: e1000439.

309. Suspene R, Aynaud MM, Koch S, Padeloup D, Labetoulle M, et al. (2011) Genetic editing of herpes simplex virus 1 and Epstein-Barr herpesvirus genomes by human APOBEC3 cytidine deaminases in culture and in vivo. *J Virol* 85: 7594-7602.
310. Vartanian JP, Guetard D, Henry M, Wain-Hobson S (2008) Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. *Science* 320: 230-233.
311. Arias JF, Koyama T, Kinomoto M, Tokunaga K (2012) Retroelements versus APOBEC3 family members: No great escape from the magnificent seven. *Front Microbiol* 3: 275.
312. Cullen BR (2006) Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol* 80: 1067-1076.
313. Bouhamdan M, Benichou S, Rey F, Navarro JM, Agostini I, et al. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. *J Virol* 70: 697-704.
314. Sleigh R, Sharkey M, Newman MA, Hahn B, Stevenson M (1998) Differential association of uracil DNA glycosylase with SIVSM Vpr and Vpx proteins. *Virology* 245: 338-343.
315. Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH (2009) Antiviral roles of APOBEC proteins against HIV-1 and suppression by Vif. *Arch Virol* 154: 1579-1588.
316. Harris RS (2008) Enhancing immunity to HIV through APOBEC. *Nat Biotechnol* 26: 1089-1090.
317. Zheng YH, Jeang KT, Tokunaga K (2012) Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology* 9: 112.
318. Suspene R, Rusniok C, Vartanian JP, Wain-Hobson S (2006) Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. *Nucleic Acids Res* 34: 4677-4684.
319. Navarro F, Bollman B, Chen H, Konig R, Yu Q, et al. (2005) Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* 333: 374-386.
320. Jonsson SR, Hache G, Stenglein MD, Fahrenkrug SC, Andresdottir V, et al. (2006) Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins. *Nucleic Acids Res* 34: 5683-5694.
321. Huthoff H, Malim MH (2007) Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and Virion encapsidation. *J Virol* 81: 3807-3815.
322. Khan MA, Goila-Gaur R, Opi S, Miyagi E, Takeuchi H, et al. (2007) Analysis of the contribution of cellular and viral RNA to the packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions. *Retrovirology* 4: 48.
323. Cen S, Guo F, Niu M, Saadatmand J, Deflassieux J, et al. (2004) The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J Biol Chem* 279: 33177-33184.
324. Dang Y, Abudu A, Son S, Harjes E, Spearman P, et al. (2011) Identification of a single amino acid required for APOBEC3 antiretroviral cytidine deaminase activity. *J Virol* 85: 5691-5695.
325. Russell RA, Smith J, Barr R, Bhattacharyya D, Pathak VK (2009) Distinct domains within APOBEC3G and APOBEC3F interact with separate regions of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *J Virol* 83: 1992-2003.
326. Smith JL, Pathak VK (2010) Identification of specific determinants of human APOBEC3F, APOBEC3C, and APOBEC3DE and African green monkey APOBEC3F that interact with HIV-1 Vif. *J Virol* 84: 12599-12608.
327. Desimmie BA, Delviks-Frankenberry KA, Burdick RC, Qi D, Izumi T, et al. (2014) Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one Vif to rule them all. *J Mol Biol* 426: 1220-1245.
328. Guo F, Cen S, Niu M, Yang Y, Gorelick RJ, et al. (2007) The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA^{Lys} annealing to viral RNA. *J Virol* 81: 11322-11331.
329. Bishop KN, Verma M, Kim EY, Wolinsky SM, Malim MH (2008) APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 4: e1000231.
330. Li XY, Guo F, Zhang L, Kleiman L, Cen S (2007) APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* 282: 32065-32074.
331. Mbisa JL, Barr R, Thomas JA, Vandegraaff N, Dorweiler IJ, et al. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J Virol* 81: 7099-7110.

332. Luo K, Wang T, Liu B, Tian C, Xiao Z, et al. (2007) Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol* 81: 7238-7248.
333. Gillick K, Pollpeter D, Phalora P, Kim EY, Wolinsky SM, et al. (2013) Suppression of HIV-1 infection by APOBEC3 proteins in primary human CD4(+) T cells is associated with inhibition of processive reverse transcription as well as excessive cytidine deamination. *J Virol* 87: 1508-1517.
334. Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, et al. (2005) Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 435: 108-114.
335. Eckstein DA, Penn ML, Korin YD, Scripture-Adams DD, Zack JA, et al. (2001) HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. *Immunity* 15: 671-682.
336. Kreisberg JF, Yonemoto W, Greene WC (2006) Endogenous factors enhance HIV infection of tissue naive CD4 T cells by stimulating high molecular mass APOBEC3G complex formation. *J Exp Med* 203: 865-870.
337. Sonza S, Maerz A, Deacon N, Meanger J, Mills J, et al. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol* 70: 3863-3869.
338. Kamata M, Nagaoka Y, Chen IS (2009) Reassessing the role of APOBEC3G in human immunodeficiency virus type 1 infection of quiescent CD4+ T-cells. *PLoS Pathog* 5: e1000342.
339. Santoni de Sio FR, Trono D (2009) APOBEC3G-depleted resting CD4+ T cells remain refractory to HIV1 infection. *PLoS One* 4: e6571.
340. Soros VB, Yonemoto W, Greene WC (2007) Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog* 3: e15.
341. Thielen BK, Klein KC, Walker LW, Rieck M, Buckner JH, et al. (2007) T cells contain an RNase-insensitive inhibitor of APOBEC3G deaminase activity. *PLoS Pathog* 3: 1320-1334.
342. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, et al. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302: 1056-1060.
343. Luo K, Xiao Z, Ehrlich E, Yu Y, Liu B, et al. (2005) Primate lentiviral virion infectivity factors are substrate receptors that assemble with cullin 5-E3 ligase through a HCCH motif to suppress APOBEC3G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11444-11449.
344. Xiao Z, Xiong Y, Zhang W, Tan L, Ehrlich E, et al. (2007) Characterization of a novel Cullin5 binding domain in HIV-1 Vif. *J Mol Biol* 373: 541-550.
345. Yu Y, Xiao Z, Ehrlich ES, Yu X, Yu XF (2004) Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev* 18: 2867-2872.
346. Stanley BJ, Ehrlich ES, Short L, Yu Y, Xiao Z, et al. (2008) Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. *J Virol* 82: 8656-8663.
347. Bergeron JR, Huthoff H, Veselkov DA, Beavil RL, Simpson PJ, et al. (2010) The SOCS-box of HIV-1 Vif interacts with ElonginBC by induced-folding to recruit its Cul5-containing ubiquitin ligase complex. *PLoS Pathog* 6: e1000925.
348. Russell RA, Pathak VK (2007) Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol* 81: 8201-8210.
349. Schrofelbauer B, Senger T, Manning G, Landau NR (2006) Mutational alteration of human immunodeficiency virus type 1 Vif allows for functional interaction with nonhuman primate APOBEC3G. *J Virol* 80: 5984-5991.
350. Jager S, Kim DY, Hultquist JF, Shindo K, LaRue RS, et al. (2012) Vif hijacks CBF-[bgr] to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* 481: 371-375.
351. Zhang W, Du J, Evans SL, Yu Y, Yu X-F (2012) T-cell differentiation factor CBF-[bgr] regulates HIV-1 Vif-mediated evasion of host restriction. *Nature* 481: 376-379.
352. Zhang J, Wu J, Wang W, Wu H, Yu B, et al. (2014) Role of cullin-elonginB-elonginC E3 complex in bovine immunodeficiency virus and maedi-visna virus Vif-mediated degradation of host A3Z2-Z3 proteins. *Retrovirology* 11: 77.

353. Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, König R, et al. (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114: 21-31.
354. Kao S, Goila-Gaur R, Miyagi E, Khan MA, Opi S, et al. (2007) Production of infectious virus and degradation of APOBEC3G are separable functional properties of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *Virology* 369: 329-339.
355. Opi S, Kao S, Goila-Gaur R, Khan MA, Miyagi E, et al. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits packaging and antiviral activity of a degradation-resistant APOBEC3G variant. *J Virol* 81: 8236-8246.
356. Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC (2004) The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet* 5: 52-61.
357. Sadler HA, Stenglein MD, Harris RS, Mansky LM (2010) APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *J Virol* 84: 7396-7404.
358. Neogi U, Shet A, Sahoo PN, Bontell I, Ekstrand ML, et al. (2013) Human APOBEC3G-mediated hypermutation is associated with antiretroviral therapy failure in HIV-1 subtype C-infected individuals. *J Int AIDS Soc* 16: 18472.
359. Harris RS, Hultquist JF, Evans DT (2012) The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J Biol Chem* 287: 40875-40883.
360. Simon V, Zennou V, Murray D, Huang Y, Ho DD, et al. (2005) Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification. *PLoS Pathog* 1: e6.
361. Iwabu Y, Kinomoto M, Tatsumi M, Fujita H, Shimura M, et al. (2010) Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. *J Biol Chem* 285: 35350-35358.
362. Traut TW (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 140: 1-22.
363. Ellison KS, Peng W, McFadden G (1996) Mutations in active-site residues of the uracil-DNA glycosylase encoded by vaccinia virus are incompatible with virus viability. *J Virol* 70: 7965-7973.
364. Pyles RB, Thompson RL (1994) Evidence that the herpes simplex virus type 1 uracil DNA glycosylase is required for efficient viral replication and latency in the murine nervous system. *J Virol* 68: 4963-4972.
365. Selig L, Benichou S, Rogel ME, Wu LI, Vodicka MA, et al. (1997) Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *J Virol* 71: 4842-4846.
366. Willetts KE, Rey F, Agostini I, Navarro JM, Baudat Y, et al. (1999) DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase is specifically incorporated into human immunodeficiency virus type 1 viral particles through a Vpr-independent mechanism. *J Virol* 73: 1682-1688.
367. Kaiser SM, Emerman M (2006) Uracil DNA glycosylase is dispensable for human immunodeficiency virus type 1 replication and does not contribute to the antiviral effects of the cytidine deaminase Apobec3G. *J Virol* 80: 875-882.
368. Yan N, O'Day E, Wheeler LA, Engelman A, Lieberman J (2011) HIV DNA is heavily uracilated, which protects it from autointegration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9244-9249.
369. Yan N, Cherepanov P, Daigle JE, Engelman A, Lieberman J (2009) The SET complex acts as a barrier to autointegration of HIV-1. *PLoS pathogens* 5: e1000327.
370. Refsland EW, Hultquist JF, Harris RS (2012) Endogenous origins of HIV-1 G-to-A hypermutation and restriction in the nonpermissive T cell line CEM2n. *PLoS Pathog* 8: e1002800.
371. Chaipan C, Smith JL, Hu W-S, Pathak VK (2013) APOBEC3G restricts HIV-1 to a greater extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in human primary CD4+ T cells and macrophages. *Journal of virology* 87: 444-453.
372. Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, Gendelman H (1988) Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *Journal of Virology* 62: 2578-2586.
373. Orenstein JM, Fox C, Wahl SM (1997) Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 276: 1857-1861.
374. Larsson M. HIV-1 and the hijacking of dendritic cells: a tug of war; 2005. Springer. pp. 309-328.

375. Triques K, Stevenson M (2004) Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes. *Journal of virology* 78: 5523-5527.
376. McElrath MJ, Steinman RM, Cohn ZA (1991) Latent HIV-1 infection in enriched populations of blood monocytes and T cells from seropositive patients. *Journal of Clinical Investigation* 87: 27.
377. Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology* 17: 657-700.
378. Conticello SG, Thomas CJ, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS (2005) Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy) cytidine deaminases. *Molecular biology and evolution* 22: 367-377.
379. Ooms M, Krikoni A, Kress AK, Simon V, Münk C (2012) APOBEC3A, APOBEC3B, and APOBEC3H haplotype 2 restrict human T-lymphotropic virus type 1. *Journal of virology* 86: 6097-6108.
380. Bogerd HP, Wiegand HL, Doehle BP, Lueders KK, Cullen BR (2006) APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res* 34: 89-95.
381. Muckenfuss H, Hamdorf M, Held U, Perković M, Löwer J, et al. (2006) APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *Journal of Biological Chemistry* 281: 22161-22172.
382. Chen H, Lilley CE, Yu Q, Lee DV, Chou J, et al. (2006) APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr Biol* 16: 480-485.
383. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, et al. (2014) Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 343: 1221-1228.
384. Landry S, Narvaiza I, Linfesty DC, Weitzman MD (2011) APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. *EMBO reports* 12: 444-450.
385. Stenglein MD, Burns MB, Li M, Lengyel J, Harris RS (2010) APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol* 17: 222-229.
386. Suspène R, Aynaud M-M, Guétard D, Henry M, Eckhoff G, et al. (2011) Somatic hypermutation of human mitochondrial and nuclear DNA by APOBEC3 cytidine deaminases, a pathway for DNA catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 4858-4863.
387. Kaina B (2003) DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochemical pharmacology* 66: 1547-1554.
388. Mussil B, Suspene R, Aynaud MM, Gauvrit A, Vartanian JP, et al. (2013) Human APOBEC3A isoforms translocate to the nucleus and induce DNA double strand breaks leading to cell stress and death. *PLoS One* 8: e73641.
389. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, et al. (2012) Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* 149: 979-993.
390. Caval V, Suspene R, Vartanian JP, Wain-Hobson S (2014) Orthologous mammalian APOBEC3A cytidine deaminases hypermutate nuclear DNA. *Mol Biol Evol* 31: 330-340.
391. Niavarani A, Currie E, Reyat Y, Anjos-Afonso F, Horswell S, et al. (2015) APOBEC3A is Implicated in a Novel Class of G-to-A mRNA Editing in WT1 Transcripts. *PLoS one* 10: e0120089.
392. Peng G, Lei KJ, Jin W, Greenwell-Wild T, Wahl SM (2006) Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *The Journal of experimental medicine* 203: 41-46.
393. Koning FA, Newman EN, Kim E-Y, Kunstman KJ, Wolinsky SM, et al. (2009) Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets. *Journal of virology* 83: 9474-9485.
394. Cassetta L, Kajaste-Rudnitski A, Coradin T, Saba E, Della Chiara G, et al. (2013) M1 polarization of human monocyte-derived macrophages restricts pre and postintegration steps of HIV-1 replication. *AIDS* 27: 1847-1856.
395. Crespo H, Bertolotti L, Juganaru M, Glaria I, Andres Dd, et al. (2013) Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet Res* 44: (26 September 2013).
396. Thielen BK, McNevin JP, McElrath MJ, Hunt BV, Klein KC, et al. (2010) Innate immune signaling induces high levels of TC-specific deaminase activity in primary monocyte-derived cells through expression of APOBEC3A isoforms. *J Biol Chem* 285: 27753-27766.
397. Berger G, Durand S, Fargier G, Nguyen XN, Cordeil S, et al. (2011) APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. *PLoS Pathog* 7: e1002221.

398. Koning FA, Goujon C, Bauby H, Malim MH (2011) Target cell-mediated editing of HIV-1 cDNA by APOBEC3 proteins in human macrophages. *Journal of virology* 85: 13448-13452.
399. Pion M, Granelli-Piperno A, Mangeat B, Stalder R, Correa R, et al. (2006) APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 203: 2887-2893.
400. Goila-Gaur R, Khan MA, Miyagi E, Kao S, Strebel K (2007) Targeting APOBEC3A to the viral nucleoprotein complex confers antiviral activity. *Retrovirology* 4: 61.
401. Aguiar RS, Lovsin N, Tanuri A, Peterlin BM (2008) Vpr. A3A chimera inhibits HIV replication. *Journal of Biological Chemistry* 283: 2518-2525.
402. Stavrou S, Crawford D, Blouch K, Browne EP, Kohli RM, et al. (2014) Different modes of retrovirus restriction by human APOBEC3A and APOBEC3G in vivo. *PLoS Pathog* 10: e1004145.
403. Schmitt K, Guo K, Katuwal M, Wilson D, Prochnow C, et al. (2013) Lentivirus restriction by diverse primate APOBEC3A proteins. *Virology* 442: 82-96.
404. Katuwal M, Wang Y, Schmitt K, Guo K, Halemano K, et al. (2014) Cellular HIV-1 inhibition by truncated old world primate APOBEC3A proteins lacking a complete deaminase domain. *Virology* 468: 532-544.
405. Esparza-Baquer A, Larruskain A, Mateo-Abad M, Minguijón E, Juste R, et al. (2014) SNPs in APOBEC3 cytosine deaminases and their association with Visna/Maedi disease progression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.

OBJETIVOS DE LA TESIS

OBJETIVOS

La infección por lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) afecta a ovinos y caprinos de todo el mundo causando problemas en la sanidad animal así como en la economía de los productores, ya que se aumenta la tasa de remplazo de los rebaños afectados y la calidad de las producciones animales disminuye. El desarrollo lento de la enfermedad es característico de las infecciones lentivirales, sin embargo en España asistimos a la aparición de dos brotes de SRLV con características muy especiales. El primero de ellos localizado en Aragón, se caracteriza por la presencia de artritis en ovinos de la raza Rasa Aragonesa por primera vez en nuestro país. El segundo ampliamente distribuido en Castilla-León, afecta a ovinos de la raza Assaf adultos y corderos y se caracteriza por la presencia de síntomas neurológicos, siendo la primera causa de reposición en los rebaños afectados. Sin embargo, se desconocen los factores, tanto virales como del hospedador, implicados en la aparición de síntomas así como en el desarrollo de las diferentes formas de la enfermedad.

Los principales determinantes virales implicados en el tropismo se encuentran en la envoltura viral, encargada de reconocer el(los) receptor(es) celular(es) y en la región LTR, que regula la transcripción mediante la presencia de sitios de unión a factores de transcripción celular que activan o inhiben dicha transcripción. Por otro lado, el tropismo puede estar condicionado por factores del hospedador capaces de inhibir la infectividad de los virus. Por ejemplo, la maduración de monocitos a macrófagos induce la replicación de los SRLV en los tejidos diana. Los principales factores de restricción del hospedador forman parte de la respuesta inmune innata que directamente inhibe la replicación de los virus modificando el tropismo.

Esta tesis doctoral pretende, en primer lugar, aislar y caracterizar exhaustivamente las estirpes causantes de los brotes epidemiológicos detectados en nuestro país, con el objetivo de caracterizar los factores del virus y del hospedador implicados en el tropismo diferencial y diagnosticar la infección de manera específica, lo que permitirá un mejor control. Así, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a)** Aislar y caracterizar genéticamente las estirpes de SRLV implicadas en los brotes de Aragón (artritis) y Castilla-León (encefalitis).
- b)** Caracterizar biológicamente mediante estudios *in vitro* la cinética viral de ambas estirpes.
- c)** Desarrollar métodos alternativos de diagnóstico que permitan identificar específicamente ambas infecciones.
- d)** Cuantificar la expresión de las proteínas APOBEC3 ovinas en el proceso de maduración de monocito (resistentes) a macrófago (susceptibles), así como en macrófagos M1 (resistentes) y M2 (susceptibles).
- e)** Caracterizar la restricción de lentivirus homólogos (SRLV) y heterólogos (HIV) mediada por APOBEC3Z1.

CHAPTER I

CHAPTER I

Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep

ABSTRACT

Small ruminant lentiviruses (SRLV) cause different clinical forms of disease in sheep and goats. So far in Spain, Visna/Maedi virus-like (VMV-like) sequences have been found in both species, and the arthritic SRLV disease has never been found in sheep until a recent outbreak. Knowing that arthritis is common in goats, it was of interest to determine if the genetic type of the virus involved in the sheep arthritis outbreak was caprine arthritis encephalitis virus-like (CAEV-like) rather than VMV-like. Alignment and phylogenetic analyses on nucleotide and deduced amino acid sequences from SRLV of this outbreak, allowed a B2 genetic subgroup assignment of these SRLV, compatible with a correspondence between the virus genetic type and the disease form. Furthermore, an isolate was obtained from the arthritic outbreak, its full genome was CAEV-like but the pol integrase region was VMV-like. Although its LTR lacked a U3 repeat sequence and had a deletion in the R region, which has been proposed to reduce viral replication rate, its phenotype in sheep skin fibroblast cultures was rapid/high, thus it appeared to have adapted to sheep cells. This outbreak study represents the first report on CAEV-like genetic findings and complete genome analysis among Spanish small ruminants.

I. Glaria, R. Reina, H. Crespo, X de Andrés, H. Ramírez, E. Biescas, M.M. Pérez, J. Badiola, L. Luján, B. Amorena, D. de Andrés. *Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep*. **Veterinary Microbiology** 2009, 138: 156-162.

Área temática: VETERINARY SCIENCES. Factor de impacto: 2,874.

INTRODUCTION

Small ruminant lentiviruses (SRLV), which include the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) and the ovine visna maedi virus (VMV), cause slow and persistent neurological (encephalitis), pulmonary (interstitial pneumonia), articular (chronic arthritis) and mammary (interstitial mastitis) diseases [1]. The articular form is more frequent in goats [2], the mammary and pulmonary forms in sheep [3] and the encephalitis form is present in both, sheep and goats.

SRLV are widespread over the world [4]. The existence of a CAEV phylum more specific to the caprine host was proposed [5,6]. However, genetic analysis of SRLV revealed that there is transmission of SRLV in both directions sheep-to-goat and goat-to-sheep [7-10]. Furthermore, there are ovine SRLV sequences genetically closer to CAEV than to VMV prototypes [7,11] and caprine SRLV sequences closer to VMV than to CAEV prototypes [8,12,13]. Thus, the classification of SRLV according to the host species (isolate source) cannot always be assessed genetically.

In countries like Spain, with about 23 million sheep and 7 million goats, SRLV are highly prevalent due in part to the implementation of discontinuous and region-restricted or monospecies (either sheep or goat) control programmes. Spanish SRLV partial genetic sequences have been described recently [13,14], even though SRLV disease (Maedi Visna) had been detected in Spanish sheep long ago [15]. In this country, SRLV mainly cause pneumonia and mastitis in sheep [16] and arthritis in goats [17]. However, a disease characterized by carpal joint synovitis, together with interstitial mastitis and/or pneumonia was detected among sheep from a farm in the Aragonese region of Spain in 2005 [18]. In this area, sheep SRLV had previously led to interstitial mastitis and/or progressive pneumonia in the absence of arthritis [16].

A SRLV isolate from a Spanish SRLV ovine arthritis outbreak was obtained and analyzed genetically in this study as well as other SRLV sequences from the same arthritis outbreak, revealing a phylogenetic proximity to goat prototypes (CAEV-like B2 clade). The isolate was biologically characterized *in vitro* and its tissue distribution analyzed by

PCR. This is the first study on the complete sequence and biological and genetic characterization of a Spanish ovine SRLV isolate. The results suggest a link between viral genetic type and disease form, independently of the *in vitro* phenotype of the isolate.

MATERIALS AND METHODS

Animals and samples

SRLV-infected adult sheep of the Rasa Aragonesa breed were used. Animals (Nos. 44, 84, 258, 449, 496 and 497) belonged to highly prevalent flocks located in the North-East of Spain and were chosen among VMV seropositive sheep according to ELISA (Elitest, Hyphen Biomed) and clinical signs compatible with SRLV articular disease.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from EDTA-blood on a Ficoll-Hypaque gradient ($d=1.077$; Lymphoprep Asix-Shield, Oslo). One cubic centimetre samples of mammary gland, brain, lung and articular joint tissue were also collected and embedded in RNAlater (Qiagen) as well as bronchoalveolar lavage (BAL) post-mortem.

Virus isolation and phenotyping

To successfully isolate the virus, synovial fluid from both carpal joints (left and right) from one of the arthritic sheep (No. 496) was incubated with permissive adherent cells from sheep choroid plexus (SCP) and foetal ovine synovial membrane (FOS) in DMEM (GIBCO) containing 1% lamb serum (LS) and antibiotic-anti-mycotics (Life Technologies). Culture supernatants were used to further infect skin fibroblasts cells (SFC) in order to determine the ability of the viral stock to trigger syncytium formation and to titrate the virus according to RT-activity in supernatants (Reverse Transcriptase Assay Chemiluminescent, Roche). The titre was determined using known EV1 strain titres for standard and determining the correlation between TCID₅₀ and RT activity. The phenotype of this isolate was identified according to: a) the virus titre reached in fibroblast culture supernatants, being low, medium or high (titres of less than 10⁶, from 10⁶ to 10⁷ and higher than 10⁷, respectively); and b) the time required for productive infection in the different cells, the phenotype being rapid, intermediate or slow (when

syncytia appeared within a week, a few weeks or over a month, respectively). Determination of RT activity was done at days 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 21 and 42 post-inoculation (p.i.).

PCR procedures

Genomic DNA was extracted from PBMC, tissue samples and SFC with QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Tissue samples were previously lysed in buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5; 5 mM EDTA; 400 mM NaCl; 0.2% SDS) containing Proteinase K (50 µg per 10⁷ PBMC, Sigma) at 56°C for 1h.

For detection and comparison of virus in different tissues and cells, partial amplification of LTR (about 300 nt) and *gag* (about 490 nt) regions was performed using primers previously described (LTR: procedure by Extramiana et al. 2002 [19], primers of Zanoni et al. 1992 [20]; *gag*: [21]). PCR amplifications of *gag* and *pol* regions used for phylogeny were performed using the methodology and primers previously described [8].

For complete sequencing of the arthritic isolate, the primers quoted above and those designed in our laboratory either from GenBank sequences or partial sequences of isolate 496 obtained in this study were used (Table 1).

The reaction mix of the PCRs consisted of: Reaction Buffer 1× (Biotools), 2 mM MgCl₂ (Biotools), 225 µM of each dNTP (Biotools), 600 nM of each primer, 0.04 U/µl of Pfu DNA polymerase (Biotools) and 1 µg of sample DNA in a final volume of 30 µl. PCR conditions were: initial denaturation step for 5 min at 94°C followed by 45 cycles of 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 40 s and extension at 72°C for a variable period depending on size of the amplicon, followed by a final extension of 10 min at 72°C.

RNA from FOS, goat synovial membrane cells (GSM) and skin fibroblast cells infected *in vitro* with isolate 496 was extracted with RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) for the analysis of *rev* transcripts. Reverse transcription was done with SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) using oligo-dT primers. Amplification of *rev*-encoding regions was performed using adapted primers (originally described by [22]) located in LTR and *env* regions.

Table 1. Primers

Primers used for sequencing the complete genome of isolate 496, using the 496 proviral sequence as reference for nucleotide position.

Designation	Sequence (5'-3')	Orientation	Location	Region	Size (nt)	Source
env-CAEV1	GGA GCT TTG GCA GAA CTC AC	Fw	8979-8998	<i>env</i>	530	This work
LTR	CCA CGT TGG GCG CCA GCT GCG AGA	Rv	455-432	LTR		[20]
LTR	TGA CAC AGC AAA TGT AAC CGC AAG	Fw	152-176	LTR	1260	[20]
Oslo	GGC ATC ATG GCT AAT ACT TCT AA	Rv	1412-1390	<i>gag</i>		[21]
Wie5	CTT GTG TCC GAG GAT TTT GA	Fw	1324-1343	<i>gag</i>	596	Diete Klein ^{p/c}
Wie3	CGC TTG TGC TAA TAA CTG CAT	Rv	1920-1900	<i>gag</i>		Diete Klein ^{p/c}
WieRC	AAG ATG CAA GCA TGC AGG GAC	Fw	1858-1878	<i>gag</i>	1293	This work
P27	TTC TCC GGG TGT AGT TCA AAT C	Rv	3151-3130	<i>pol</i>		[8]
Pol I	TGG ATG ATA TYT AYA TAG GRA GTG	Fw	2989-3012	<i>pol</i>	1158	This work
Pol II	AAA TCA TAY CCW GCA TCT TC	Rv	4147-4128	<i>pol</i>		This work
P29	GGT GCC TGG ACA TAA AGG GAT TC	Fw	4025-4047	<i>pol</i>	1174	[8]
P35	GCC ACT CTC CTG RAT GTC CTC T	Rv	5199-5178	<i>pol</i>		[8]
Pol II	GGA CAA GCC CTA TGG ATA TWT	Fw	5068-5088	<i>pol</i>	1150	This work
Tat	GGT TAC ATA GYC TRC AHC CAC AD	Rv	6218-6196	<i>tat</i>		This work
Val Tat	CAA MGA TGG CTH GCW ATG C	Fw	6092-6110	<i>tat</i>	939	[6]
SU1	TCT GTR CAD GAD ACW GCT YTT GC	Rv	7031-7009	<i>env</i>		This work
SU2	GCA GGR AVM ATM AGR GGA AGA TT	Fw	6874-6896	<i>env</i>	939	This work
MOR567	CCA CAT WGT TGT CCA ATT HGT DTT	Rv	7813-7789	<i>env</i>		[43]
SU3	GAT GYA AYT GYW CAM GRT CAG G	Fw	7682-7703	<i>env</i>	747	This work
TM1	GCT TCY ACY CKA GCH ACT C	Rv	8429-8411	<i>env</i>		This work
TM2	TRG CHA AAG GVR TAM GMA TC	Fw	8381-8400	<i>env</i>	846	This work
LTR RC	GCG GTT ACA TTT GCT KTG TCA	Rv	9227-9206	LTR		This work

^{p/c}: Personal communication.

Cloning and sequencing

Amplicons obtained by PCR were purified from agarose gels according to standard procedures and cloned into pGEMT-easy[®] vector (Promega) following the manufacturer's instructions. Cloned DNA was then sequenced using BigDye[®] Terminator v3.1 chemistry on a 3730 DNA Analyzer (Applied-Biosystems, Foster City, CA). Three independent clones were obtained and sequenced per sample analysed

Sequence alignment and phylogenetic analysis

Nucleotide sequences were analyzed with Chromas 2.23 (Technelysium, Helensvale, Australia) and edited with the program BioEdit [23]. The corresponding amino acid sequences were obtained using internet server Expasy (Expert Protein Analysis System) (<http://us.expasy.org>). Multiple alignments for comparisons and phylogenetic studies were made with ClustalX [24] and the PHYLIP (Phylogeny Inference Package version 3.5c) bioinformatics programs. The nucleotide distance matrix was calculated with the DNAdist program and the amino acid distance matrix with the PROTDist program. Phylogenetic trees (phylograms) were subsequently produced in both cases with the Neighbour Joining method with Kimura's correction. The statistical confidence limits of the phylogram topology were determined with 1000 bootstraps. The TREEVIEW 1.3 [25] program was used to visualize and edit phylograms. Results obtained with over 500 bootstraps were considered as highly likely.

GenBank sequences used in alignments and phylograms

The sequences included in alignments and/or phylograms were: EV1 (S51392), P1OLV (AF479638), SAOMVV (M31646), 85/34 USA (AY101611, U64439) and KV1514 (M10608) as complete sheep SRLV sequences; and CAEVCo (M33677), Swiss goat isolate (AY445885, AY445886), CAEV Gansu (AY900630) and CAEV1GA (AF322109) as complete goat SRLV sequences. The phylogenetic tree on the 1.2 kb *pol* segment included Spanish sequences previously amplified by our group [13], one from sheep (Ov1, DQ632733) and two from goats (C1, DQ632734; C3, DQ632735) followed by their group designation (A1 to D). This tree as well as the tree based on the 1.8 Kb *gag-pol* segment included sequences with the four-digit numeric assignment [8], followed by their group designation (A1 to D). The *gag-pol* tree also includes [B2] sequences from Leroux et al. (1995) and Grego et al. (2002) (GenBank accession numbers: U35808, U35679 and U35680, and AY265456, respectively).

Nucleotide sequence Accession numbers

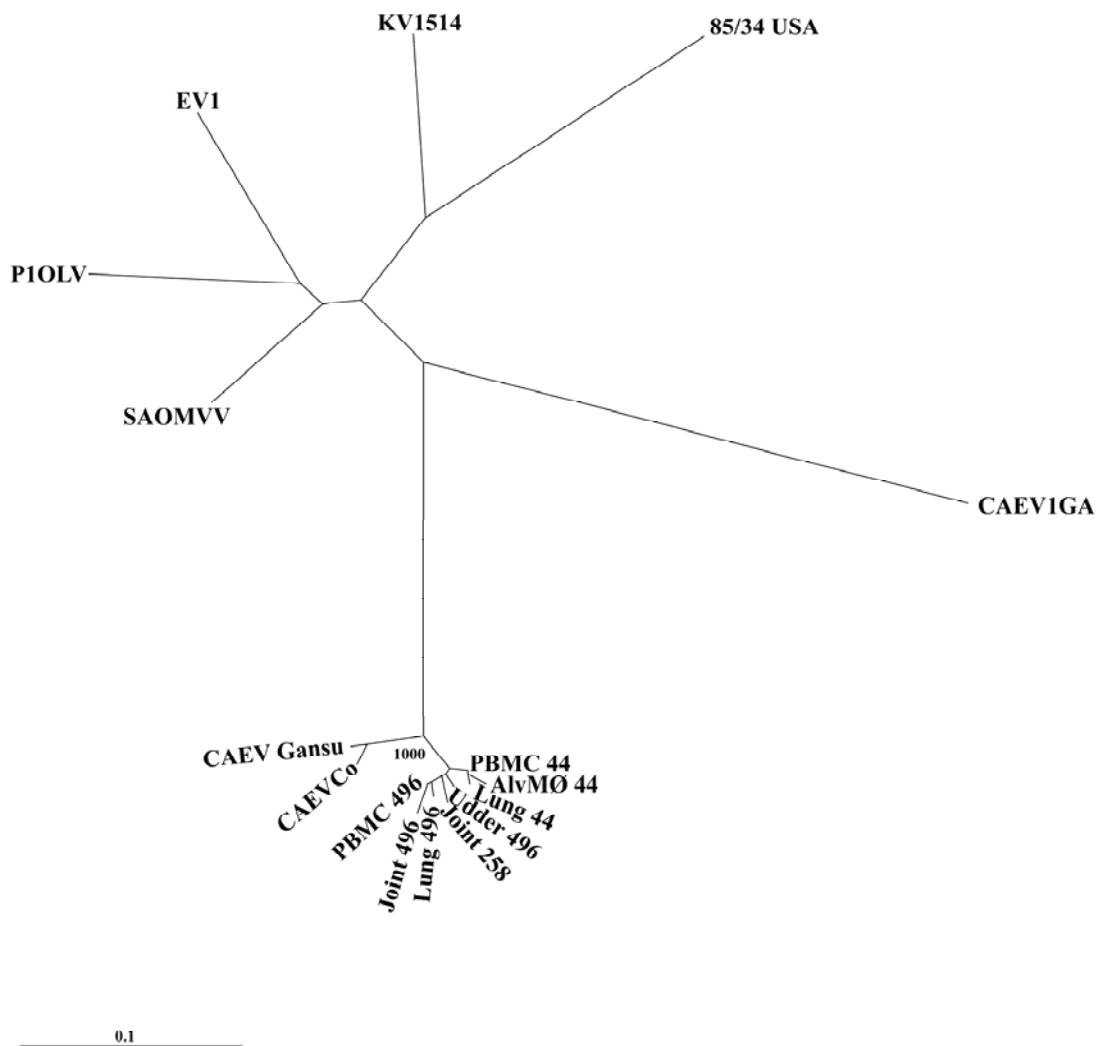
Partial sequences from the six animals under study and the whole genome sequence of isolate 496 were given GenBank accession numbers: FJ187802-FJ187812 for *gag* amplicons; FJ187813-FJ187820 for LTR amplicons; and FJ195346 for complete genome.

RESULTS

Sequence similarity and phylogenetic analysis

In previous studies [13] we have shown that phylogenetic trees produced from the sequences of short LTR and *gag* amplicons obtained by PCR procedures used in regular typing, had the same topology as those obtained by long *gag-pol* and *pol* amplicons described [8]. Thus, using sequences from short LTR and *gag* amplicons, we first determined the degree of homology among the sequences obtained from the six arthritic sheep of the outbreak under study (Nos. 44, 84, 258, 449, 496 and 497). All the sequences were found highly similar to each other. The tree topology (Fig. 1), based on partial LTR and *gag* sequences, was compatible with the assignment of the sequences from the arthritic sheep of this outbreak to group B.

a)



b)

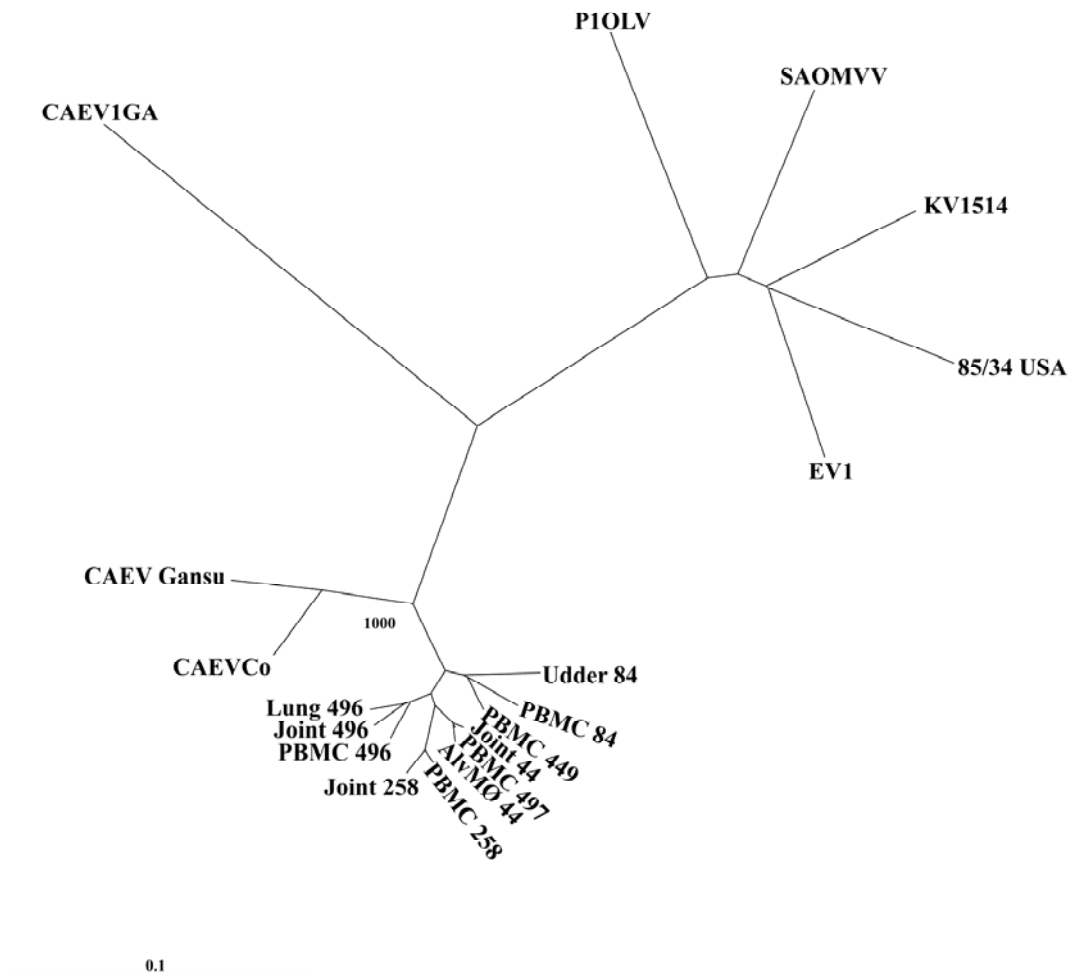


Fig. 1. Nucleotide phylograms indicating the distribution of sequences obtained in the Spanish ovine arthritis outbreak (from different animals and tissues) and GenBank SRLV sequences, VMV-like (EV1, SAOMVV, P1OLV, KV1514 and 85/34 USA) and CAEV-like (CAEV1GA, CAEV Gansu and CAEVCo) into phylogenetic groups for two genomic regions. (a) LTR (300 nt segment). (b) *gag* (530 nt segment). Outbreak sequences were obtained from sheep Nos. 44, 258, 497, 84 and 496. Bootstrap values and the infected tissue where the sequence was obtained (peripheral blood mononuclear cells, PBMC; joint; lung; and alveolar macrophages - AlvMØ -) are indicated.

The SRLV sequences analyzed in both trees were from several tissues of the arthritic sheep involved (PBMC, lung, joint, udder, alveolar macrophages - AlvMØ -).

However, the virus was not found in brain (we did not succeed in obtaining PCR amplicons in brain tissue), confirming the clinical diagnosis (sheep arthritis) and the absence of CNS infection (Visna-like) verified at necropsy.

As to the degree of similarity, the viral sequences obtained from different tissues of these animals were highly similar to each other in the LTR (94.5-99.2%) and *gag* amplicons obtained (92.1-98.8% for nucleotides and 92.5-100% for aminoacids). Furthermore, sequences from the different infected tissues had a higher degree of similarity with those of caprine (CAEVCo) than those of ovine (KV1514) prototype strains. For example, the similarity values of the sequences from tissues of sheep No. 496 were 92.5-94.5% for *gag* aminoacids and 91.0-92.9% for LTR compared with CAEVCo; and 62.1-63.4% for *gag* aminoacids and 49.2-50.3% for LTR compared with KV1514. Thus, the similarity values found were in agreement with the observed phylogenetic proximity (Fig. 1).

Phylogenetic assignment

The complete genome of the virus isolated from animal No. 496 was sequenced (GenBank accession number FJ195346) using genomic DNA from fibroblast cultures infected with this isolate. The genome consisted of 9136 bp. The complete sequence was obtained by sequencing overlapping PCR amplicons. A phylogenetic study involving this sequence and known full-length genomes was then carried out. Isolate 496 sequence was closer to CAEV-like than to VMV-like sequences (Fig. 2), supported by sequence similarity analysis (Table 2). The topology of trees was supported by high bootstrap values.

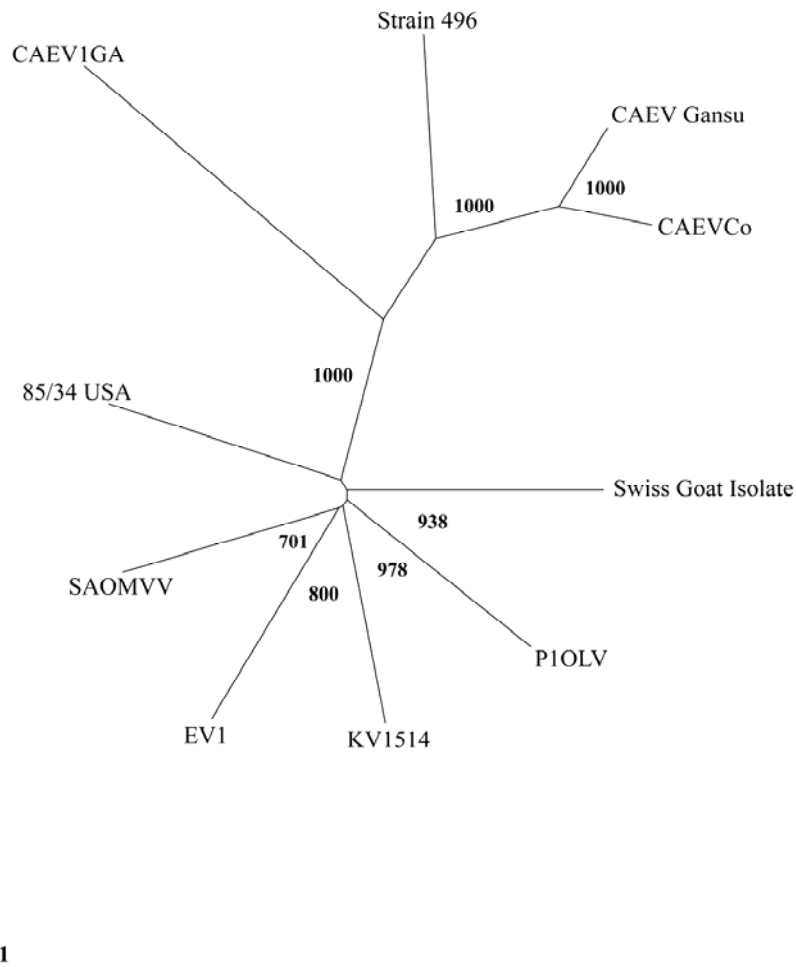


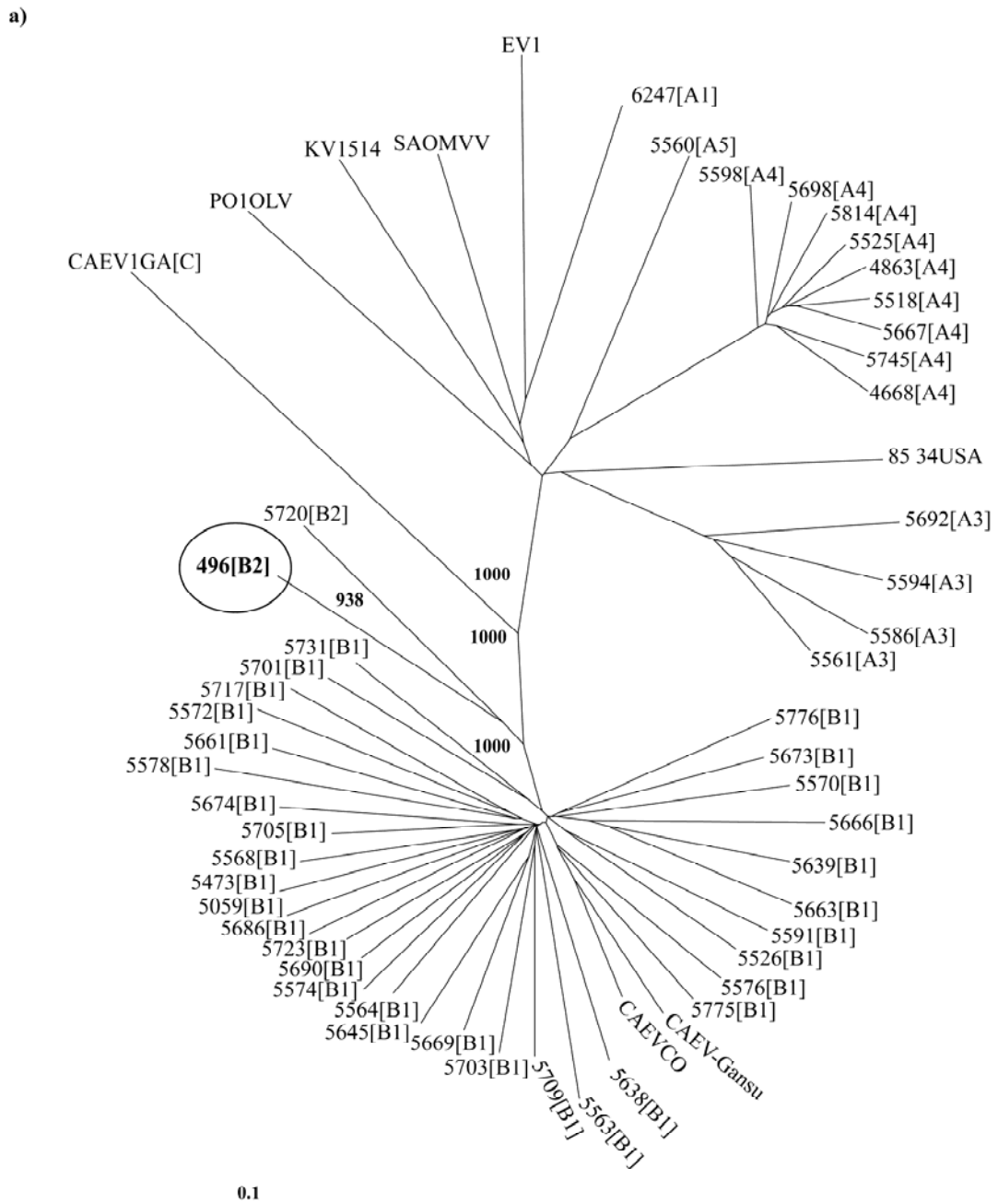
Fig. 2. Nucleotide phylogram indicating the assignment of the complete sequence of isolate 496 from the ovine Spanish arthritis outbreak amongst complete GenBank SRLV sequences, VMV-like (EV1, SAOMVV, P1OLV, KV1514 and 85/34 USA and a Swiss Goat isolate) and CAEV-like (CAEV1GA, CAEV Gansu and CAEVCo) to a CAEV-like phylogenetic group. Bootstrap values are indicated.

Table 2. Sequence similarity analysis

Similarity (%) between the amino acid sequences of isolate 496 and those of MVV-like and CAEV-like prototypes.

Protein	VMV-like prototypes	CAEV-like prototypes
Gag	70.8-72.4	91.0-92.1
Pol	74.0-76.6	81.5-84.2
Env	55.9-59.3	75.8-76.8
Signal -peptide	24.6-26.8	56.0-58.0
Mature SU	64.4-68.7	76.9-77.0
TM	54.1-57.0	81.4-83.7
Vif	45.6-53.4	76.4-77.2
Tat	43.6-46.3	78.1-80.4
Rev	18.5-24.3	50.7-52.2

Next, we used long pol (1.2 Kb) and gag-pol (1.8 Kb) amplicons [8] in order to assign 496 sequence to a specific phylogenetic subgroup, finding that 496 belonged to the B2 subgroup (Fig. 3). Once again, the topology of trees was supported by high bootstrap values.



b)

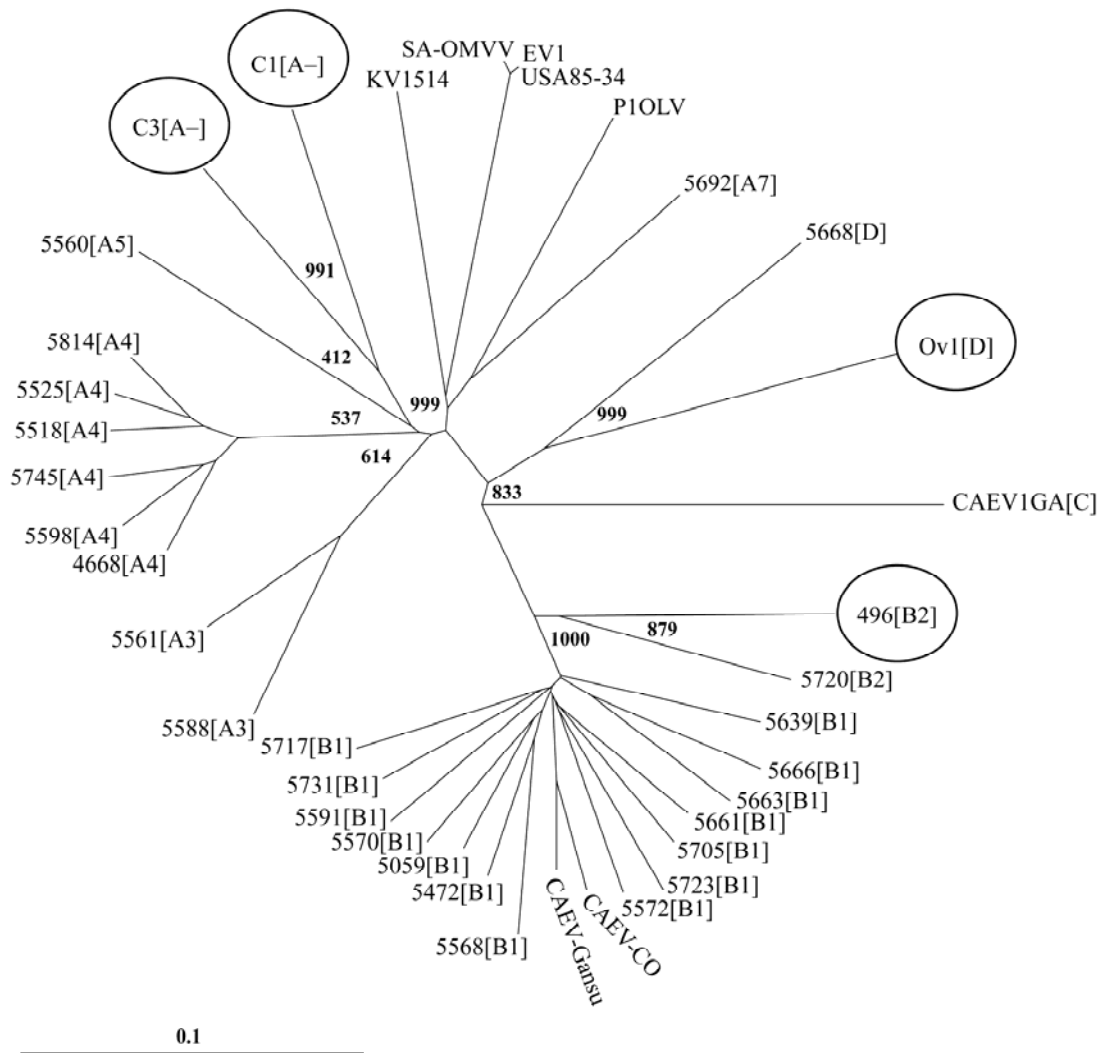


Fig. 3. Nucleotide phylogram indicating the assignment of isolate 496 sequence from the ovine Spanish arthritic outbreak to the phylogenetic sub-type B2. (a) 1.2 kb *gag-pol* segment [8]. (b) 1.8 kb *pol* segment [8]. Isolate 496 and the Spanish sheep and goat sequences from our previous studies [13] are circled. Bootstrap values are indicated in (b). Phylogenetic subtypes are within brackets.

Biological properties of the isolate

Virus with infectious capacity was successfully recovered from culture supernatants of FOS and SCP cells with synovial fluid (SF) from the left or right carpal joint of animal No. 496. Productive infection (RT-positive supernatants and presence of CPE) was first observed in these cells after 3 days. Supernatants of these cultures were then collected and used to infect skin fibroblasts, which formed syncytia (and yielded RT-positive supernatants) within 2-4 days post-inoculation (p.i.), regardless of their being autologous or heterologous (Fig. 4). The virus titre reached a value close to 10^8 TCID₅₀ between 5 and 9 days p.i. and decreased thereafter, as cells started to die by day 10 post-inoculation. SCP and FOS cells allowed viral production but to a lower extent than ovine skin fibroblasts. Thus, the in vitro phenotype of isolate 496 was rapid in FOS and SCP cells, and rapid/high in fibroblasts.

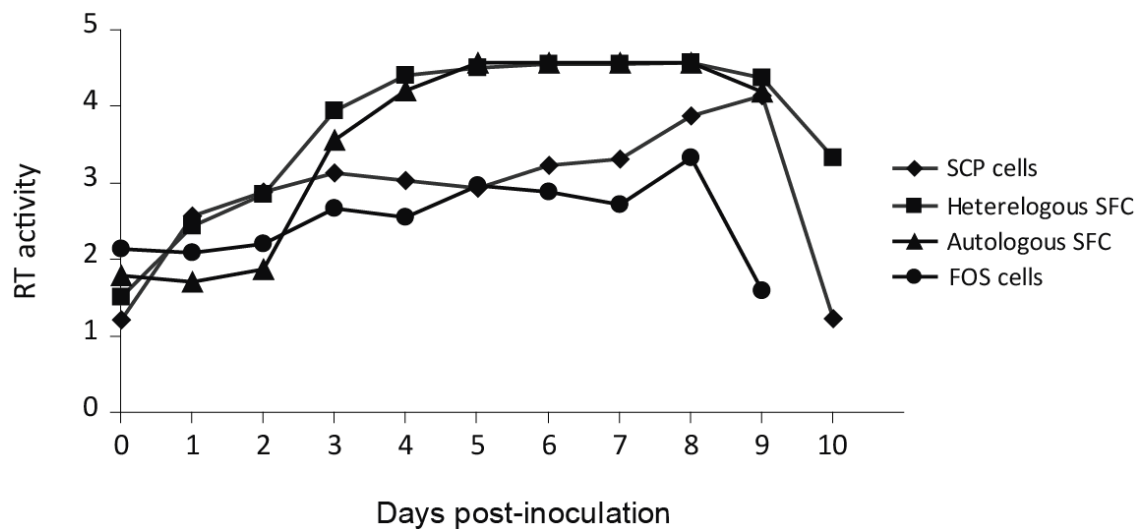


Fig. 4. Viral production of isolate 496 measured by reverse transcriptase (RT) activity in culture supernatants of different cell types: Sheep choroid plexus (SCP), foetal ovine synovial membrane (FOS) cells and heterologous and autologous sheep skin fibroblast cells (SFC).

Features of the genetic regions and proteins of the isolate

At least three clones per region were sequenced and a consensus sequence produced when the difference between the corresponding three amplicon sequences was <1%. The features of each region are shown in the following sections.

LTR region

Repeat regions and AP-1, AP-4, AML (vis), CAAAT, TAS and GAS sites of LTR are associated with viral production and/or strain phenotype and tropism [26-32]. The arthritic Spanish isolate 496 lacked a LTR repeat present in some VMV-like isolates (37-53 nt) or CAEV-like isolates (70 nt in CAEVCo) (Fig. 5). Although the AP-4 site ($T^T/CAGCTG^T/C^G$), [33] and the TATA-box (sequence TATAWAA) were conserved, the AP-1 site distribution in sequence 496 was similar to that of CAEVCo. Distal to TATA box, 496 had one AP-1 site ($T^T/G^G/C^G/TCA$, [33]), CAEVCo had two sites (one of them corresponding to the repeat), and the VMV-like sequence KV1514 had 4 sites (two belonging to the repeat). Proximal to TATA box 496 had, like CAEVCo, three AP-1 sites, and the VMV-like sequence KV1514 had 2 sites (one of them also present in the CAEVCo and 496). Moreover, 496 LTR presented only one highly conserved AML (vis) site ($TAACC^G/A^A$ CA, [27]), lacking the AML sequence close to the TATA box present in reference strains of ovine origin. The distribution of CAAAT, GAS and TAS sites of LTR was similar to that of CAEVCo, except that 496 lacked the 70 nt repeat that also contains these sites. Both sequences (496 and CAEVCo) have only one AP-4 site and one AML (vis) site. In addition, the R region of 496 presented a deletion, similar to that found in CAEVCo, in other highly pathogenic strains such as SAOMVV and in some strains from sub-clinically infected sheep [29,34], but absent from ovine KV1514 and caprine CAEV1GA (Fig. 5).

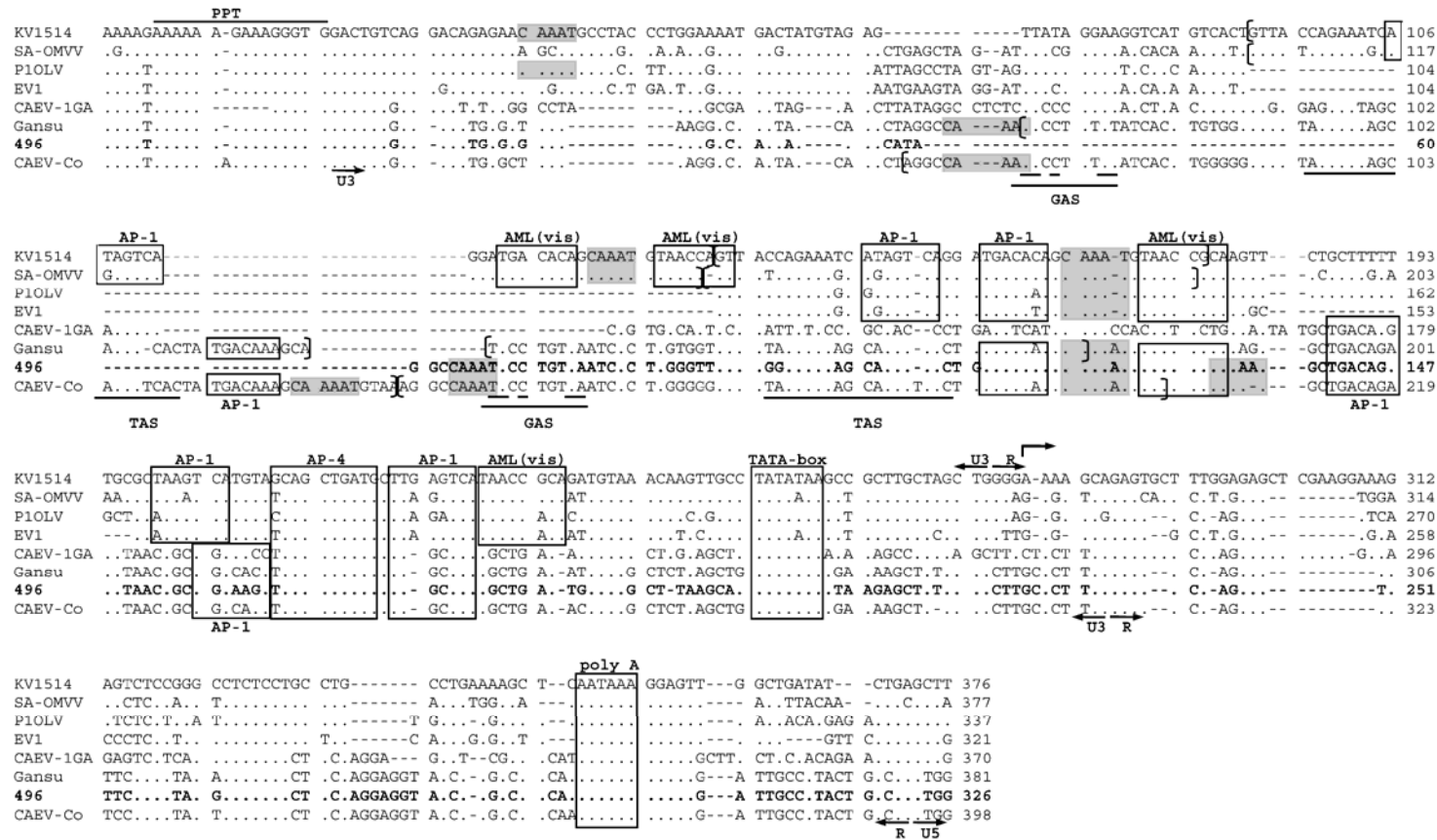


Fig. 5. Alignment of U3-R sequences of the LTR region from SRLV isolates. Sequences are aligned against KV1514 prototype. Dots indicate identity with KV1514 and dashes represent gaps. The boundaries between U3, R and U5 are indicated by straight arrows. A bent arrow indicates the start site of transcription. AP-1, AP-4 and AML(vis) motifs, the TATA box and the polyadenylation signal are marked by boxes. The TAS and GAS sites are underlined. The polypurine tract region is marked with a horizontal line above the sequence. The grey boxes represent the CAAAT sequences. Repeat regions are within brackets. The sequence of isolate 496 is in boldface.

Gag region

Analysis of the complete putative Gag amino acid sequence revealed that the arthritic isolate 496 had a similarity with VMV-like and CAEV-like isolates of 70.8-72.4% and 91-92.1%, respectively. Furthermore, most of the amino acid substitutions in gag-496 sequence were similar to those of CAEVCo. The 496 gag-p17 sequence, a protein (matrix, MA) rich in basic amino acids, presented two conserved motifs within the immunodominant epitope and a seven amino acid deletion [10,35] found in other CAEV-like and not in VMV-like sequences (Fig. 6). In the 496 gag-p25 (capsid, CA) protein, two major epitopes and a major homology region (MHR) were quite conserved [36-38] and, similar to CAEVCo, a deletion located just after the first immunodominant epitope, present in other SRLV strains, was missing [39], and the amino acid downstream this sequence (leucin, L) was conserved [40]. Finally, as to the nucleocapsid (NC) protein, gag-p14, we found a CAEV-like one-amino acid deletion close to the beginning of p14, and a deletion at the carboxy terminal of the p14 sequence, absent from CAEVCo, but present in some VMV-like sequences (such as KV1514).

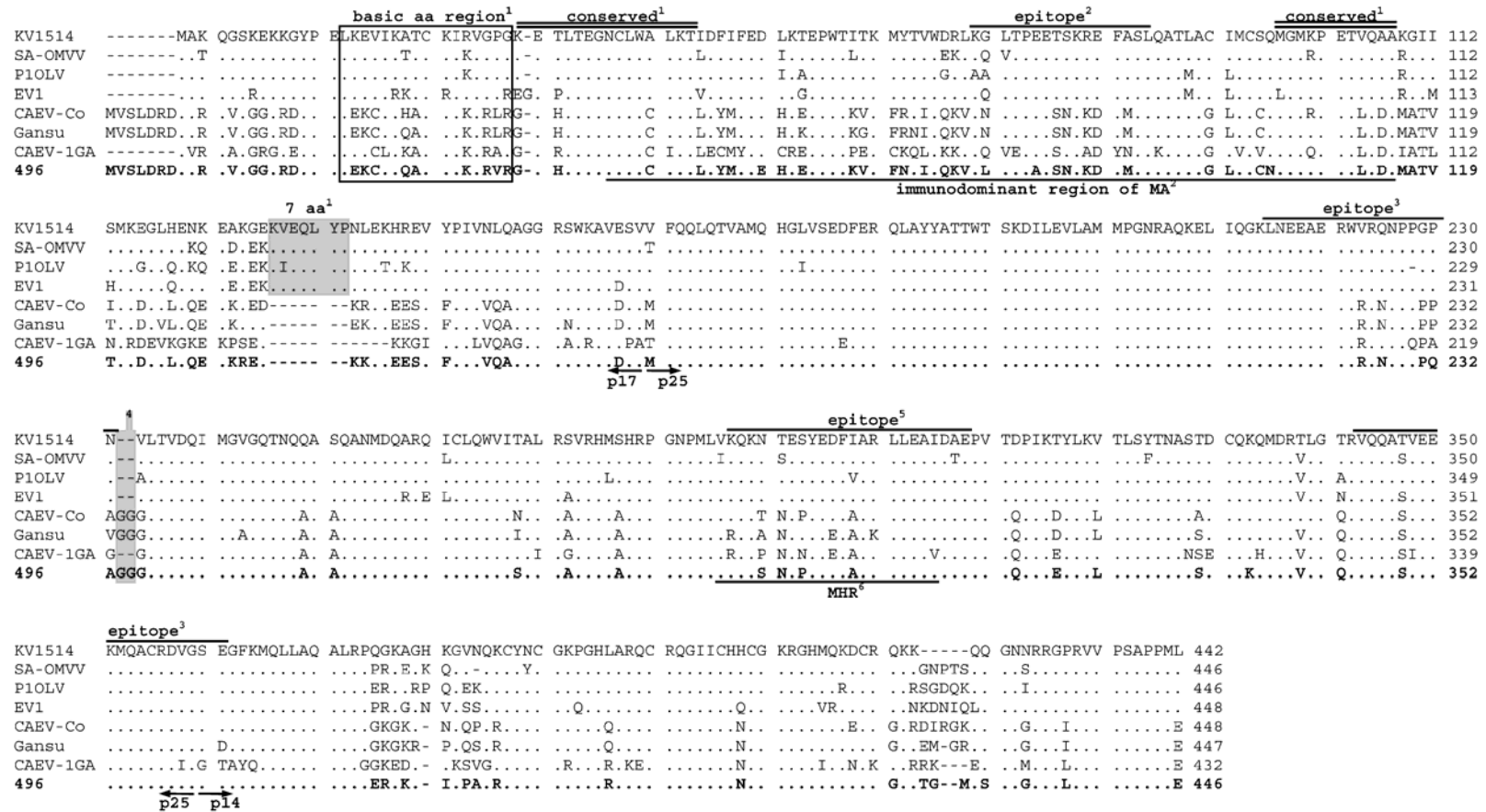


Fig. 6. Alignment of deduced amino acid sequences of the Gag region from SRLV isolates. Sequences are aligned against KV1514 prototype. Dots indicate identity and dashes gaps. The boundaries between p17, p25 and p14 are indicated by arrows. The basic amino acid region is marked by a box. Conserved regions among caprine SRLV are marked with a double horizontal line above the sequence. Epitope-containing regions are marked with a line above the sequence. Grey boxes represent insertion/deletions that help to distinguish VMV-like from CAEV-like isolates. The immunodominant region of p17 (MA) and the major homology region of p25 are underlined. References are referred to as the following numbers: 1, [10]; 2, [35]; 3, [36]; 4, [39]; 5, [37]; and 6, [38].

Pol region

The *pol* amino acid sequence of isolate 496 was similar to VMV-like and CAEV-like isolates (74-76.6% and 81.5-84.2% similarity), respectively. Significantly, a stretch of 17 amino acids in the integrase DNA binding domain (third integrase domain) of isolate 496 was VMV-like (Fig. 7), although 496 had a CAEV-like sequence very close to CAEVCo and CAEV Gansu in other *pol* sub-regions.

KV1514	FCYYRTR	KRGHPGEWQG	PTQVLWGGDG	AIVVKDRGTD	RYLVIANKDV	KFIPP	1094	
SA-OMVVV.L.E.E.	...I..KNLE	K.....K...Q	1079	
P1OLVI.D...E.E.KT.E	K.....A	1078	
EV1	...SEI.D.L.	..S...E.E.	..KI...TL.	K.....Q	1075	
CAEV-CoI.QESGKD	QPRYCGK.	KE P.....	IESE	K...PY..A 1103	
Gansu	-SVITEG	.EDI	QESGKD	QLRYCGK.	KE P.....	TERQ	K...PY..A 1095
CAEV-1GAI.N.	..E...E.E.KES.PY..A	1101	
496D.E.K.E.	...I..KNSE	K...VP...A	1094	

Fig. 7. Alignment of deduced amino acid sequences of the integrase DNA binding domain of the Pol region from SRLV isolates. Sequences are aligned against KV1514 prototype. Dots indicate identity with KV1514 and dashes represent gaps. The grey box represents VMV-like sequences. CAEV-like sequences are marked by a box. The sequence of isolate 496 is in boldface.

Env region

The predicted 496 Env protein sequence was 948 amino acids long. This raw sequence had a similarity with VMV-like and CAEV-like isolates of 55.9-59.3% and 75.8-76.8%, respectively.

The sequence of the 496 predicted signal peptide sub-region (upstream the cleavage site) had a similarity with CAEV-like and VMV sequences of 56-58% and 24.6-26.8%, respectively. The 496 signal peptide was similar in length to other CAEV-like sequences, but it was 9-10 amino acids shorter than VMV-like sequences in the amino terminal end. Within this region (Fig. 8a), there was a 30 amino acid hydrophobic domain, as shown by Bendtsen prediction programme [41]. This region was 8-10 amino acids shorter (5-7 amino acids in the case of 496) in CAEV-like sequences compared with VMV-like sequences.

a)

	hydrophobic region											
KV1514	GKKKSWVSID	LLGTEG-KDI	KKVNIWEPCE	KWFAQVVWGV	LWVLQIVLWG	CLMWEVRKG-	-NQQA	64				
SA-OMVV	..E.....	...KQEGKR	Q.....G.W.	..GIKI..VM	...I.LM...	..I..MG.K-	-HS.N..	65				
PIOLV	...H...N	...I.Q-.EE	N.....	..W..LI...	...MI...	..I..MG.NT	-.K.A..	65				
EV1	..R.P...E	I...KHDQEK	E...V.....	...G.L..VT	SRYIRL...	..I..MQ.ES	KG.....	67				
CAEV-Co	..YQPQ..KQ	IGNRNT----	-----N..F	AYKGIPL.R-	---ISLTM.I	L.---GINMC	---VS..	47				
Gansu	..YRPQ..KP	IINRDT----	-----NTSF	AYKGIPL..	---I..TM.I	L.---WTNMC	---VR..	47				
496	..Y.PQ..EQ	I.NGDT----	-----NT.L	TYAWIFL..	---I.LT..I	L.LLQWPSMG	---K..	50				
CAEV-1GA	..Y.KQ..R-	-----	-----	-----	-----TIVI	L.---TVRAA	---LQ..	25				

cleavage site

b)

	V5							
KV1514	QRYQVIRVRA	YTYGVVEMPQ	SYMEERGENR	RSRRNLQ-RK	KR		656	
SA-OMVV	.K...K...D..K	A.R.KNMR.K	..TEISRP..	..		662	
PIOLVD..K	A.S.KK---K	.QPQS...R	..		657	
EV1	.K..I.....E.D...	..L.KN---	.RNAFKKE..	..		671	
CAEV-Co	.K...K...I...E	N.AKT.II..	KK.ELSHK..	..		632	
Gansu	.K...K...I...E	N.AKT.II..	.K.ELSHT..	..		630	
CAEV-1GAID..D	N.ETLP--G.	.R.DLAKA..	..		552	
496	.K.....MID..S	.HNQR--ST.	.K.ELGHR..	..		635	
	<u>CONSENSUS</u>			<u>VARIABLE</u>				
	<u>SU5</u>							

c)

		QHYCVTST	RSEVANYV ¹	
	GGQELDCW	HYQHVCVTST	KS ²	
		YQELDCW	HYQHCVTS ³	
KV1514	MMVYQELDCW	HYQHVCVTST	RSEVANYVNW	766
SA-OMVV	..L.H.....T...Q...	772
PIOLV	..L.H.....K.A..M...	767
EV1K...K...	781
CAEV-Co	I.L.....	..HQ..I...	KT...K.I..	742
Gansu	I.L.....	..HQ.....	.AD..K.I..	740
CAEV-1GA	..L...V...	..HQ.....	.ADIV..I..	662
496	I.L.....	..HQ.....	.A...K.I..	745
		QELDCW	HYHQCITS ⁴	

Fig. 8. Alignment of deduced amino acid sequences of the Env region from SRLV isolates. Sequences are aligned against KV1514 prototype. Dots indicate identity with KV1514 and dashes represent gaps. The sequence of isolate 496 is in boldface. a) Signal peptide: the hydrophobic region is marked with a horizontal line above the sequence, and the cleavage site with a vertical line. b) Carboxy terminal of the surface (SU) region: the V5 variable region is marked with a horizontal line above the sequence. The consensus and the variable sub-regions of the SU5 region [43] are underlined. Grey boxes represent potential cleavage sites. c) Transmembrane (TM) region with potential epitopes: the grey box outlines the differences between VMV-like and CAEV-like sequences. Epitopes described in the literature are shown above and below the alignment: 1, [74]; 2, [76]; 3, [77]; 4, [75].

The predicted sequence of the mature SU protein of 496 had 551 amino acid residues. This sequence showed a similarity with VMV-like and CAEV-like isolates of 64.4-68.7% and 76.9-77%, respectively. The sequence contained 22 cysteine residues, which are conserved among all SRLV. Nineteen potential well conserved N-glycosylation sites (Asn-Xaa-Ser/Thr) were present in this sequence, according to Gupta's prediction programme [42], 4 less than in CAEVCo. In the SU region, V1-V4 domains [5] of the SU protein of isolate 496 were conserved compared with CAEVCo. On the contrary, the SU5 variable region that corresponds to the V5 domain [43], highly variable among SRLV, was quite different from that of CAEVCo (Fig. 8b). The 496 SU sequence presented two potential cleavage sites between SU and TM proteins (RRKR and RKKR), the latter being the likely cleavage site generating these two proteins [44].

The TM subunit consisted of 313 amino acids, including 4 potential N-glycosylation sites conserved in all SRLV. This sequence had a similarity with VMV-like and CAEV-like isolates of 54.1-57% and 81.4-83.7%, respectively. One of the immunodominant epitopes (Fig. 8c), widely used in ELISA diagnosis, was also detected in isolate 496 and had a CAEV-like (HQ) sequence.

Rev, vif and tat regions

In order to identify *rev* transcripts, FOS, GSM and skin fibroblastic cells were first infected *in vitro* with isolate 496. Subsequently, *rev* transcripts were amplified from mRNA using adapted primers located in LTR and *env* regions [22]. Three different amplicons (562 bp, 483 bp and 437 bp) were obtained from skin cells and two (562 bp and 437 bp) from FOS and GSM cells (Fig. 9a). Amplicon sequencing revealed the presence of four exons in the *rev* gene with the following locations: exon 1 in the LTR region; exon 2 at the 3' end of *pol*; exon 3 at the 5' end of *env*; and exon 4 at the 3' end of *env*. The longest amplicon was integrated by exons 1, 3 and 4; the medium-size amplicon contained exons 1, 2 and 4; and the shortest amplicon contained exons 1 and 4.

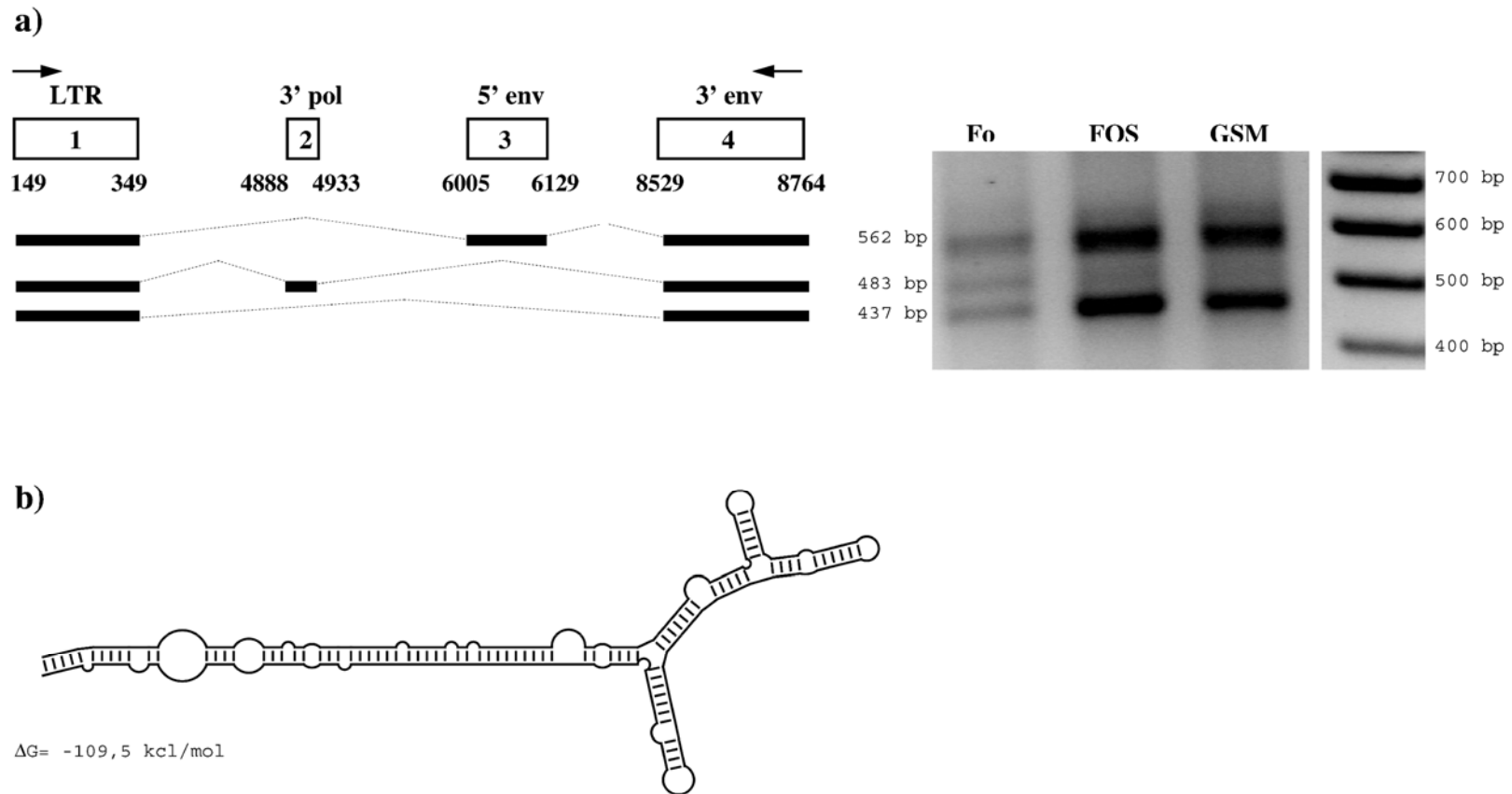


Fig. 9. Analysis of *rev* transcripts and Rev Responsive Element (RRE) from 496 isolate. a) Organization of *rev* transcripts. Exons are represented as boxes. RT-PCR products generated from total RNA obtained from fibroblasts (Fo, lane 1), foetal ovine synovial membrane cells (FOS, lane 2) and goat synovial membrane cells (GSM, lane 3) are shown using agarose gel electrophoresis. The numbers on the left of the figure represent transcript lengths. b) Predicted RNA secondary structure of the RRE domain.

The nucleotide sequences of the amplicons at the 3' end were completed with the sequence of the *env* region obtained in this study. The putative open reading frame (ORF) of the longest amplicon corresponded to a deduced protein sequence of 134 amino acids (involving exons 3 and 4), analogous to that described in the B1 CAEV Gansu strain [45]. Alignment of this sequence with other SRLV-Rev protein sequences indicated that this region had a low similarity with known CAEV-like and VMV-like isolates (50.7-52.2% and 18.5-24.3%, respectively). In spite of the low similarity, the functional domains [46-49] were localized in the 496 Rev sequence as follows: a) the N-terminal domain that is required for optimal Rev Responsive Element binding (RRE); b) the basic domain (arginine-rich tract) that mediates specific binding to RRE and provides the signal for nuclear/nucleolar localization; and c) the Nuclear Export Signal (NES), a leucine rich domain that mediates Rev's interaction with host cell factors (predicted with NetNES 1.1 Server, [50]).

The RRE was located in the TM region by comparing the complete genome of 496 with RRE sequences previously described [47,51,52]. The putative RRE was 246 nucleotides long and spanned from nucleotide No. 7901 to 8146. The RNA secondary structure of the localized RRE domain (Fig. 9b) was predicted to form a stable stem-loop (CLC Combined Workbench 3 programme) similar to that previously found in CAEV-like sequences [49].

The medium size transcript (483 bp) corresponded to a putative protein of 103 amino acids involving exons 2 and 4 and the shortest amplicon contained no potential ORF.

Alignment of the predicted amino acidic sequences of Tat and Vif proteins with sequences of other isolates indicated that these regions had higher similarity with known CAEV-like isolates than with VMV-like isolates (78.1-80.4% and 43.6-46.3%, respectively for Tat protein; 76.4-77.2% and 45.6-53.4% for Vif protein). Furthermore, the 496 nucleotide sequence presented an 8 bp overlap between *tat* and *vif* ORFs like most of the CAEV-like sequences [22].

Overall, the *rev* transcripts and the regulatory genes *tat* and *vif* of isolate 496 showed higher similarities with CAEV-like than with VMV-like sequences.

DISCUSSION

Numerous contributions have analysed SRLV sequences in different countries, although only a few have studied complete genomes. These include the Icelandic VMV KV1514 [53], South African SAOVMV [54], Portuguese P1OLV [55], American (USA) 85/34 USA [56] and Scottish EV-1 [57] from sheep, as well as the American CAEV-Cork (CAEVCo infectious clone from USA) [51], Chinese CAEV Gansu [58] and Norwegian CAEV1GA [22] from goats. This study analyses the complete sequence and determines the biological and genetic properties, including the phylogenetic assignment, of an isolate from an outbreak of SRLV-induced arthritis in Spanish sheep, an unusual disease form in this species in Spain. Viral sequences from blood, lung, mammary gland and joints of the sheep outbreak confirmed the existence of a small genetic variability within the host, as shown in previous SRLV studies [59]. Furthermore, the genetic sequence of isolate 496 and partial SRLV sequences of other sheep from the outbreak were very close to each other and to the CAEV-like prototype CAEVCo. This is compatible with a multi-systemic infection caused by one major genetic SRLV type within the individual and the outbreak.

Studies on the *in vitro* behaviour (phenotype) of the isolates are limited [30,31]. Interestingly, isolate 496 showed a high replication rate *in vitro* (a phenotype commonly found in sheep and not in goat isolates; [30], regardless of the ovine or caprine origin of the cells used to propagate it. These findings are compatible with a goat-to-sheep transmission that may have occurred *in vivo* under field conditions commonly found in Spain, where goats are used to feed lambs in meat breeds favouring the cell-to-cell contact [60]. The original goat virus may thus have adapted to the new ovine host, acquiring genetic properties that confer this rapid/fast phenotype. Transgression of the species barrier has been previously reported [7,9] leading to the appearance of CAEV-like

sequences in sheep upon contact with goats [11,20,56,61], including those of subtype B1 [10].

Phylogenetic analyses revealed that the SRLV from the outbreak specifically belonged to the B2 CAEV-like subgroup. In contrast, the previously described sequences in Spain from sheep and goats belonged to A and D VMV-like groups [13]. B2 sequences have been found in sheep and goats [8] with lentivirus-induced arthritis. Thus, in these studies and this work there would appear to be an agreement between the phylogenetic group to which strain 496 was assigned (B2, CAEV-like) and the clinical form observed (SRLV arthritis, rarely present in sheep, but common in goats).

Recent phylogenetic analyses of SRLV have been mostly based on the *pol/rev* [8-10,14,55], *gag* [8,9,14,35,55,62,63] and *env* genes [64,65] but only a few have compared regulatory genes such as *tat*, *rev* and *vif* [66] and long terminal repeats, LTR [55,67]. LTR contains known functional sites involved in DNA transcription, such as AP-1, AP-4 [28,30,33] and AML (*vis*) [27], besides the TATA-box and the polyadenylation signal. LTR transcriptional factor binding sites have been proposed to regulate promoter activity, viral growth and replication efficiency [27,31,55,68]. Thus, an increased number of these sites, including the presence of LTR repeats of 71bp in CAEV-like [32] and 37-57bp in VMV-like isolates appears to affect the strain phenotype and tropism [28,31,55], leading to enhanced promoter activity and a rapid/high lytic phenotype [55]. The absence of both the 71 and 35-53 bp repeats in isolate 496 indicate that these duplications are not essential for a fast/high phenotype. However, deletion of these repeats is able to abolish the activity of the promoter in SCP cells in some SRLV infections [31]. The LTR sequence of isolate 496 had 4 AP-1 sites and 1 site of each GAS, TAS, AP-4 and AML. GAS and TAS motifs, described as binding sites for gamma interferon and tumour necrosis factor, respectively [26,32,69] as well as AP-4 site, TATA-Box and PolyA-signal were highly conserved in this isolate, which confirmed previous findings [55] and strongly suggests that maintenance of these sites is essential to the virus.

Deletion of one of the two CAAAT sites of LTR (CAAAT a and b) may result in viruses which are non-replicative in SCP cells [31]. Here we describe sequences from a fully replicative virus in SCP cells lacking the CAAAT of the repetition in the U3 region of LTR. However, in the 496 sequence there were two extra CAAAAT sites, both of them downstream the CAAAT site, which may help to explain the high replication capacity of this isolate.

A 13-14 bp deletion has been found previously in the R region of the SRLV-LTR from asymptomatic sheep and not in SRLV of pneumonia-affected sheep in Greece [29,34]. Interestingly, in our study this deletion was found in sequences from the clinically affected sheep involved, regardless of the sample source (PBMC, choroid plexus, lung, carpal joint or mammary gland), suggesting that factors besides this deletion are involved in the appearance of clinical symptoms.

Also consistent with the high viral production phenotype of isolate 496 was the finding that a point mutation in the capsid (CA, p25) region, known to negatively affect replication in macrophages [40], was missing from this isolate (having the amino acid leucine instead of arginine).

Retrotranscription and integration are integrase-related crucial steps for an efficient productive infection. In contrast with the observations on the remaining regions of the 496 genome, the integrase DNA binding domain of this isolate was highly similar to that of VMV-like isolates and the caprine isolate CAEV1GA, and was quite different from that of CAEVCo and CAEV Gansu goat isolates. Whether this is related to the VMV-like phenotype (rapid/high) of isolate 496 observed *in vitro* often observed in sheep isolates is unknown. This phenotype is also compatible with the appearance of a high number of affected animals in this outbreak, considering that a high viral load enhances the development of clinical signs [70]. Further studies are needed to fully understand the precise mechanisms by which LTR sites and other genetic regions are involved in SRLV pathogenesis.

So far, SRLV diagnosis has been most frequently carried out using a serological approach [71]. Gag-based ELISAs include immunodominant epitopes present in p25-capsid, p14-nucleoprotein or p17-matrix proteins and can either detect VMV-like or CAEV-like infection jointly or individually [14,35,72]. With the exception of p14 (NC) carboxy-terminal deletion, which resembled VMV-like sequences, overall the three gag proteins of isolate 496 were CAEV-like, including the presence/absence of deletions and conserved motifs useful to distinguish CAEV-like from VMV-like infections [14,35,39,72,73]. Thus, the animals belonging to the arthritic outbreak should be tested using a CAEV-like based ELISA for epidemiological purposes.

Due to the high variability and the robust antibody production elicited against Env antigens (in TM and SU5), these antigens are also widely used in serodiagnosis. In the variable SU domains of isolate 496, V1-V5 epitope motifs previously described in other isolates [5] were conserved. Likewise, the cysteine loop in domain V4, equivalent to the loop present in HIV V3 domain [22], was well conserved. Regarding the SU5 immunodominant epitope [43] in the highly variable V5 domain, the 496 sequence presented a 2 amino acid deletion when compared with the reference strain CAEVCo (Fig. 8b) and 3 amino acid substitutions within the consensus sequence (RVRAYTYG^V/_M^V/_I DMP^K/_S), indicating outbreak differential features in this domain.

One of the immunodominant epitopes of the TM subunit of isolate 496 (Fig. 8c), spanning residues 83 to 103, has been used frequently in ELISA to detect SRLV infection [43,74-77]. This epitope has a 2 amino acid inversion (QH vs. HQ) that distinguishes (QH)-VMV-like from (HQ)-CAEV-like isolates (including 496), potentially being of use in diagnosis.

Overall, the results on the CAEV-like genetic characteristics and on the Gag and Env proteins of the SRLV from the arthritis sheep outbreak highlight the interest of studying the relationship between viral genetic characteristics and tropism. These results also underline the need to avoid inter-species contact, including feeding of newborn lambs by goat infected mothers in mixed flocks and common pasture feeding. Finally,

these results confirm the interest of developing strain specific SU5-based local or outbreak-specific ELISAs, especially in SRLV epidemiological studies and control programmes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from Spanish CICYT AGL2003-08977-C03-01, AGL2006-13410-C06-01, AGL2007-66874-C04-01 and Government of Navarra Project No. IIQ010449.R11. Ramsés Reina and Ximena de Andrés had a fellowship FPI from the Spanish Ministry of Science and Education.

REFERENCES

1. Narayan O, Cork LC (1985) Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev Infect Dis* 7: 89-98.
2. Zanoni R, Krieg A, Peterhans E (1989) Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J Clin Microbiol* 27: 580-582.
3. Harmache A, Vitu C, Guiguen F, Russo P, Bertoni G, et al. (1998) Priming with tat-deleted caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV. *J Virol* 72: 6796-6804.
4. Adams DS, Oliver RE, Ameghino E, DeMartini JC, Verwoerd DW, et al. (1984) Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet Rec* 115: 493-495.
5. Valas S, Benoit C, Baudry C, Perrin G, Mamoun RZ (2000) Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *J Virol* 74: 6178-6185.
6. Valas S, Benoit C, Guionaud C, Perrin G, Mamoun RZ (1997) North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology* 237: 307-318.
7. Leroux C, Chastang J, Greenland T, Mornex JF (1997) Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* 142: 1125-1137.
8. Shah C, Boni J, Huder JB, Vogt HR, Muhlherr J, et al. (2004) Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology* 319: 12-26.
9. Shah C, Huder JB, Boni J, Schonmann M, Muhlherr J, et al. (2004) Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J Virol* 78: 7518-7522.
10. Pisoni G, Quasso A, Moroni P (2005) Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339: 147-152.
11. Chebloune Y, Karr B., Sheffer D., Leung K., Narayan O. (1996) Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *Journal of General Virology*: 2037-2051.

12. Celer V, Jr., Celer V, Nejedla E, Bertoni G, Peterhans E, et al. (2000) The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech Maedi-Visna isolates based on gag gene sequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 203-215.
13. Reina R, Mora MI, Glaria I, Garcia I, Solano C, et al. (2006) Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res* 121: 189-198.
14. Grego E, Profiti M, Giammarioli M, Giannino L, Rutili D, et al. (2002) Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 828-832.
15. Badiola J, Gonzalez, L., Gelabert, JL. Demonstration of Maedi Visna in Spain.; 1983; Edimburgh.
16. Lujan LL (1991) Estudio de la prevalencia y formas de presentación del maedi visna ovino en la cuenca media del Ebro, Tesis Doctoral. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.
17. Contreras A, Corrales JC, Sanchez A, Aduriz JJ, Gonzalez L, et al. (1998) Caprine arthritis-encephalitis in an indigenous Spanish breed of dairy goat. *Vet Rec* 142: 140-142.
18. Biescas E (2006) Contribución al estudio serológico, lesional, diagnóstico y preventivo del Maedi Visna ovino. Zaragoza: Universidad de Zaragoza. 231 p.
19. Extramiana B, González, L., Cortabarría, N., García, M., Juste, RA. (2002) Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Rum Res* 44: 109-117.
20. Zaroni RG, Nauta IM, Kuhnert P, Pauli U, Pohl B, et al. (1992) Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet Microbiol* 33: 341-351.
21. Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, DeRock E, et al. (1993) Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res* 54: 1858-1862.
22. Gjerset B, Storset AK, Rimstad E (2006) Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J Gen Virol* 87: 573-580.
23. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT; 1999. Oxford University Press. pp. 95-98.
24. Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, Collins ME (2003) DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine* 21: 2082-2092.
25. Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358.
26. Sepp T, Tong-Starksen SE (1997) STAT1 pathway is involved in activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat in monocytes. *J Virol* 71: 771-777.
27. Sutton KA, Lin CT, Harkiss GD, McConnell I, Sargan DR (1997) Regulation of the long terminal repeat in visna virus by a transcription factor related to the AML/PEBP2/CBF superfamily. *Virology* 229: 240-250.
28. Agnarsdottir G, Thorsteinsdottir H, Oskarsson T, Matthiasdottir S, Hafliadottir BS, et al. (2000) The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 81: 1901-1905.
29. Angelopoulou K, Brellou GD, Greenland T, Vlemmas I (2006) A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus Res* 118: 178-184.
30. Barros SC, Andresdottir V, Fevereiro M (2005) Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Arch Virol* 150: 201-213.
31. Oskarsson T, Hreggvidsdottir HS, Agnarsdottir G, Matthiasdottir S, Ogmundsdottir MH, et al. (2007) Duplicated sequence motif in the long terminal repeat of maedi-visna virus extends cell tropism and is associated with neurovirulence. *J Virol* 81: 4052-4057.

32. Murphy B, Jasmer DP, White SN, Knowles D (2007) Localization of a TNF-activated transcription site and interactions with the gamma activated site within the CAEV U3 70 base pair repeat. *Virology* 364: 196-207.
33. Gabuzda DH, Hess JL, Small JA, Clements JE (1989) Regulation of the visna virus long terminal repeat in macrophages involves cellular factors that bind sequences containing AP-1 sites. *Mol Cell Biol* 9: 2728-2733.
34. Angelopoulou K, Poutahidis T, Brellou GD, Greenland T, Vlemmas I (2008) A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. *Vet J* 175: 346-355.
35. Grego E, Bertolotti L, Carrozza ML, Profiti M, Mazzei M, et al. (2005) Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Vet Microbiol* 106: 179-185.
36. Rosati S, Mannelli A, Merlo T, Ponti N (1999) Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res* 61: 177-183.
37. Fluri A, Nenci C, Zahno ML, Vogt HR, Charan S, et al. (2006) The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T- and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. *Vaccine* 24: 597-606.
38. Mammano F, Ohagen A, Hoglund S, Gottlinger HG (1994) Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J Virol* 68: 4927-4936.
39. Ravazzolo AP, Reischak D, Peterhans E, Zanoni R (2001) Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. *Virus Res* 79: 117-123.
40. Gudmundsson B, Jonsson SR, Olafsson O, Agnarsdottir G, Matthiasdottir S, et al. (2005) Simultaneous mutations in CA and Vif of Maedi-Visna virus cause attenuated replication in macrophages and reduced infectivity in vivo. *J Virol* 79: 15038-15042.
41. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783-795.
42. Gupta R, Brunak S (2002) Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput*: 310-322.
43. Mordasini F, Vogt HR, Zahno ML, Maeschli A, Nenci C, et al. (2006) Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *J Clin Microbiol* 44: 981-991.
44. Duckert P, Brunak S, Blom N (2004) Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel* 17: 107-112.
45. Gazit A, Mashiah P, Kalinski H, Gast A, Rosin-Abersfeld R, et al. (1996) Two species of Rev proteins, with distinct N termini, are expressed by caprine arthritis encephalitis virus. *J Virol* 70: 2674-2677.
46. Abelson ML, Schoborg RV (2003) Characterization of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) rev N-terminal elements required for efficient interaction with the RRE. *Virus Res* 92: 23-35.
47. Saltarelli MJ, Schoborg R, Pavlakis GN, Clements JE (1994) Identification of the caprine arthritis encephalitis virus Rev protein and its cis-acting Rev-responsive element. *Virology* 199: 47-55.
48. Schoborg RV, Saltarelli MJ, Clements JE (1994) A Rev protein is expressed in caprine arthritis encephalitis virus (CAEV)-infected cells and is required for efficient viral replication. *Virology* 202: 1-15.
49. Kalinski H, Yaniv A, Mashiah P, Miki T, Tronick SR, et al. (1991) rev-like transcripts of caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 183: 786-792.
50. la Cour T, Kiemer L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, et al. (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17: 527-536.
51. Saltarelli M, Querat G, Konings DA, Vigne R, Clements JE (1990) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179: 347-364.

52. Schoborg RV, Clements JE (1996) Definition of the RRE binding and activation domains of the caprine arthritis encephalitis virus Rev protein. *Virology* 226: 113-121.
53. Sonigo P, Alizon M, Staskus K, Klatzmann D, Cole S, et al. (1985) Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 42: 369-382.
54. Querat G, Audoly G, Sonigo P, Vigne R (1990) Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology* 175: 434-447.
55. Barros SC, Ramos F, Duarte M, Fagulha T, Cruz B, et al. (2004) Genomic characterization of a slow/low maedi visna virus. *Virus Genes* 29: 199-210.
56. Karr BM, Chebloune Y, Leung K, Narayan O (1996) Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology* 225: 1-10.
57. Sargan DR, Bennet ID, Cousens C, Roy DJ, Blacklaws BA, et al. (1991) Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 8): 1893-1903.
58. Qu J, Guo,W. and Xiang,W. (2005) Gene cloning and sequence analysis of the whole genome of CAEV-GANSU. GenBank.
59. Pisoni G, Moroni P, Turin L, Bertoni G (2007) Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology*.
60. Mselli-Lakhal L, Guiguen F, Fornazero C, Du J, Favier C, et al. (1999) Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology* 259: 67-73.
61. Leroux C, Cordier G, Mercier I, Chastang J, Lyon M, et al. (1995) Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. *Arch Virol* 140: 1-11.
62. Angelopoulou K, Karanikolaou K, Papanastasopoulou M, Koumpati-Artopiou M, Vlemmas I, et al. (2005) First partial characterisation of small ruminant lentiviruses from Greece. *Vet Microbiol* 109: 1-9.
63. Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, et al. (2007) Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J Gen Virol* 88: 3423-3427.
64. Germain K, Valas S (2006) Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. *Virus Res*.
65. Herrmann LM, Hotzel I, Cheevers WP, On Top KP, Lewis GS, et al. (2004) Seven new ovine progressive pneumonia virus (OPPV) field isolates from Dubois Idaho sheep comprise part of OPPV clade II based on surface envelope glycoprotein (SU) sequences. *Virus Res* 102: 215-220.
66. Castro RS, Greenland T, Leite RC, Gouveia A, Mornex JF, et al. (1999) Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *J Gen Virol* 80 (Pt 7): 1583-1589.
67. Zaroni RG (1998) Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J Gen Virol* 79 (Pt 8): 1951-1961.
68. Hess JL, Small JA, Clements JE (1989) Sequences in the visna virus long terminal repeat that control transcriptional activity and respond to viral trans-activation: involvement of AP-1 sites in basal activity and trans-activation. *J Virol* 63: 3001-3015.
69. Murphy BG, Hotzel I, Jasmer DP, Davis WC, Knowles D (2006) TNFalpha and GM-CSF-induced activation of the CAEV promoter is independent of AP-1. *Virology* 352: 188-199.
70. Zhang Z, Watt NJ, Hopkins J, Harkiss G, Woodall CJ (2000) Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J Virol Methods* 86: 13-20.
71. Reina R, Berriatua E, Lujan L, Juste R, Sanchez A, et al. (2008) Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *Vet J*.
72. Lacerenza D, Giammarioli M, Grego E, Marini C, Profiti M, et al. (2006) Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 112: 264-271.
73. Leroux C, Vuillermoz S, Mornex JF, Greenland T (1995) Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *J Gen Virol* 76 (Pt 6): 1533-1537.

74. Kwang J, Torres J (1994) Oligopeptide-Based Enzyme Immunoassay for Ovine Lentivirus Antibody Detection. *J of Clinical Microbiology* 32: 1813-1815.
75. Bertoni G, Zahno ML, Zanoni R, Vogt HR, Peterhans E, et al. (1994) Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *J Virol* 68: 7139-7147.
76. Saman E, Van Eynde G, Lujan L, Extramiana B, Harkiss G, et al. (1999) A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 734-740.
77. Rosati S, Profiti M, Lorenzetti R, Bandecchi P, Mannelli A, et al. (2004) Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections. *J Virol Methods* 121: 73-78.

CHAPTER II

CHAPTER II

Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak

ABSTRACT

An extensive outbreak characterized by the appearance of neurological symptoms in small ruminant lentivirus (SRLV) infected sheep has been identified in Spain, but the genetic characteristics of the strain involved and differential diagnostic tools for this outbreak remain unexplored. In this work, 23 Visna-affected naturally infected animals from the outbreak, 11 arthritic animals (both groups presenting anti-Visna/Maedi virus serum antibodies), and 100 seronegative animals were used. Eight of the Visna-affected animals were further studied post-mortem by immunohistochemistry. All had lesions in spinal cord, being the most affected part of the central nervous system in six of them. A representative strain of the outbreak was isolated. Together with other proviral sequences from the outbreak the virus was assigned to genotype A2/A3. *In vitro* culture of the isolate revealed that viral production was slow/low in fibroblast-like cells but it was high in blood monocyte-derived macrophages. The long terminal repeat (LTR) of the viral genome of this isolate lacked an U3-duplication, but its promoter activity in fibroblast-like cells was normal compared to other strains. Thus, viral production could not be inferred from the LTR promoter activity in this isolate. Analysis of the viral immunodominant epitopes among SRLV sequences of the outbreak and other known sequences allowed the design of a synthetic SU peptide ELISA that detected the Visna affected animals, representing a tool of epidemiological interest to control viral spread of this highly pathogenic strain.

I. Glaria, R. Reina, H. Ramírez, X. de Andrés, H. Crespo, P. Jauregui, E. Salazar, L. Luján, M.M. Pérez, J. Benavides, V. Pérez, L. Polledo, J.F. García-Marín, J.I. Riezu, F. Borrás, B. Amorena, D. de Andres. *Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak*. **Veterinary Microbiology** 2012, 155: 137-146.

Área temática: VETERINARY SCIENCES. Factor de impacto: 3,256.

INTRODUCTION

Small ruminant lentiviruses (SRLVs) are a heterogeneous group of viruses currently classified into five genotypes according to phylogenetic studies. Genotype A corresponds to Visna/Maedi virus (VMV)-like strains, genotype B includes caprine arthritis encephalitis virus (CAEV)-like isolates, genotype C is present in SRLVs from Norwegian sheep and goats, genotype D has been identified by analysing *pol* SRLV sequences from Swiss and Spanish sheep and finally genotype E has been found in SRLV from Italian goats [1-5].

VMV was firstly described by Icelandic researchers in the 1950's as the cause of a wasting disease causing a neurological form characterized by ataxia and paralysis of the hind legs [6]. Strains isolated from the infected animals clustered together genetically as part of the genotype A [7]. A molecular Icelandic VMV clone has been generated and tested for neuropathogenicity *in vivo* [8] to reproduce experimentally the disease, finding that it affects mainly the periventricular area, with an association between the severity of central nervous system (CNS) lesions and the frequency of virus isolations [6, 9]. A duplicated sequence within the viral LTR of the Icelandic neurological strains has been described as a determinant of cell tropism [10], such that deletion of a CAAAT sequence from this duplication, reduces viral growth in choroid plexus cells. In addition, duplicated CAAAT sequences have been found in neurological but not in field Maedi cases [10].

In sheep from the Mediterranean area, where pneumonia and/or mastitis are mainly reported [11], the appearance of arthritis is restricted to particular areas [12] and encephalitis (Visna) is rare [13], except for the extensive neurological outbreak found in Assaf sheep of the central (North West) area of Spain [14-16], an area with more than 4 million sheep and about 170,000 goats where numerous cases of the neurological form have been diagnosed. The affected animals of this outbreak are being prematurely culled and present histological lesions with similarities to those described formerly in Icelandic sheep. However in this outbreak, the frequency of appearance of clinical symptoms is higher than in any previous work (other than the Icelandic epidemic) and a significant proportion of the clinically affected animals is

below two years of age, and can be as young as 4-6 months. The spinal cord of the clinical infections appears as a main lesion site and some animals show myelitis as the only lesion, in the absence of brain lesions [14-16]. Furthermore, the disease affects young and adult animals, with high mortality rates causing significant production losses [14].

SRLV infection is mainly controlled by serology-based diagnosis and culling of seropositive animals and their offspring. The viral envelope SU5 hypervariable region antigens have been amongst the most frequently used to develop ELISA serotyping tools [17]. However, serum antibody titres may fluctuate, leading to misdiagnosis. Alternatively, PCR may help to detect infection at early stages, but low viral load and genetic variability may reduce significantly its diagnostic efficiency. The available diagnostic tools have helped to detect so far infections in the Spanish outbreaks of the arthritic [12] and neurological [15] forms of SRLV disease, but do not appear to discriminate the infections according to the outbreak.

This work aims to isolate and characterize genetically and biologically a representative highly pathogenic strain of the Spanish neurological outbreak. Genetic characterization and immunologic profiling of the outbreak viral sequences allowed the development of a serological tool based on a synthetic peptide ELISA for differential detection of outbreak neuropathogenic strain infection, a tool which may be of use in diagnosis, control and epidemiological studies, particularly in Europe.

MATERIALS AND METHODS

Animals and samples

The study of clinically affected animals from the Spanish region of Castilla y León involved seven adult (> 2 years of age) Assaf sheep, one male and six females, and a Milchscharf ewe, having neurological clinical signs (no other macroscopic signs) compatible with Visna (i.e. hind leg weakness, ataxia and recumbency). Each of the animals (Nos. 160, 166, 292, 336, 358, 368, 697 and 698) belonged to different flock. Prior to euthanasia, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from EDTA-blood on a Ficoll-Hypaque gradient ($d=1.077$; Lymphoprep Axis-Shield).

Euthanasia was done by intravenous injection of barbiturate overdose followed by exsanguination. Complete necropsy analysis was performed in the 8 animals. The brain and the entire spinal cord were removed and carefully examined by coronal slicing. When gross lesions appeared, samples were collected in PBS and 1% antibiotic-antimycotics (Gibco) for viral isolation. In addition, samples from the brain, including choroid plexus, several areas of the spinal cord, lung and mammary gland were collected in RNAlater (Qiagen) for genomic amplification. Alternatively, samples from the same tissue area were fixed in 10% buffered formalin for histopathological examination.

For the study on antibody-based diagnosis, serum was obtained from 34 Spanish seropositive sheep showing a single macroscopic clinical sign: 11 arthritic animals from an arthritis outbreak of Aragón (North-East Spain); and 23 Visna affected animals from the Castilla y León region (North-West Spain), belonging to flocks with high incidence of the neurological form. Also, serum from 100 seronegative control sheep, kindly provided by Drs. V. Andresdottir (University of Reykjavik) and Sergio Rosati (University of Turin) from certified SRLV-negative flocks, was used in order to determine the cut-off value (see ELISA below).

Immunohistochemistry

CNS sections from the studied animals showing lesions consistent with Visna were investigated by immunohistochemical labelling of VMV proteins, using the reagents and methods previously described [15]. Briefly, sections were incubated overnight at 4°C with a pool of monoclonal antibodies [18] against p27 and gp130 viral proteins diluted 1/50. They were then treated with biotinylated horse anti-mouse IgG diluted 1/20 for 30 min at room temperature and incubated with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite; Vector Laboratories). Sections were counterstained with haematoxylin and mounted under coverslips after developing the reaction with diaminobenzidine.

Neurological outbreak virus isolation and in vitro properties

Spinal cord from sheep No. 697 was cultured in RPMI (Gibco) containing 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotics (Gibco). After three days of

culture, the spinal cord was removed and attached cells were incubated in DMEM 2% FBS and 1% antibiotics. Supernatants were tested for RT activity weekly (HS-Lenti RT Activity Kit, Cavid) and, following DNA extraction, PCRs were performed allowing proviral detection for diagnosis of infection (see below).

The viral stock of 697 was used to infect primary cell cultures of sheep skin fibroblasts (SF), blood (monocyte) derived macrophages (BDM) and a goat synovial membrane (GSM) cell line (GSM-T lacZ cells, kindly supplied by Dr. Stephen Valas; [19], in which X-gal staining was used for detecting viral transcription. Cultures were monitored for the appearance of cytopathic effect and RT activity in the supernatant.

Other viral strains

Where indicated, the following virus sources were used for comparisons with 697 isolate: strain Ev1 [20], strain Ov496 [12] and the Icelandic clone Kv1772 [7].

Polymerase chain reaction and sequencing

Genomic DNA was extracted from PBMC, tissue samples (kept in RNAlater) and trypsinized culture cells (showing RT activity-positive supernatants) using QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Tissue samples were previously lysed in buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5; 5 mM EDTA; 400 mM NaCl; 0.2% SDS) containing Proteinase K (50 µg per 10⁷ PBMC or 10 mg of tissue; Sigma) for 1h at 56°C.

Proviral detection for infection diagnosis (classification of animals into infected and non infected categories by PCR) was carried out by partial amplification of LTR (about 300 nt) and *gag* (about 490 nt) regions, which was performed using primers previously described [4] Amplicons were cloned into pGEMT-easy® vector (Promega) following the manufacturer's instructions and then sequenced using BigDye® Terminator v3.1 chemistry on a 3730 DNA Analyzer (Applied-Biosystems). To determine the complete genome sequence of isolate 697 a set of primers newly designed (Table 1) and previously described [12] was used.

To determine *rev* sequence, RNA was extracted from 697-infected skin fibroblasts (RNeasy® Mini Kit, QIAGEN) and *rev* transcripts were analysed. Reverse transcription was done with SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) using

oligo-dT primers. PCR amplification of *rev*-encoding regions was performed using adapted primers [21] of the LTR and *env* regions.

Table 1. Primers

Primers used for PCR and sequencing of the isolate 697 complete genome.

Designation	Sequence (5'-3)'	Orientation	Location	Region	Size (nt)	Source
env-VISNA	GTG ATA GAA GCA CCA GTG GA	Fw	8591-8610	<i>env</i>	664	This work
LTR	CCA CGT TGG GCG CCA GCT GCG AGA	Rv	164-141	LTR		[40]
LTR	ACT GTC AGG RCA GAG AAC ARA TGC C	Fw	8868-8892	LTR	1331	[41]
Oslo	GGC ATC ATG GCT AAT ACT TCT AA	Rv	1108-1086	<i>gag</i>		[42]
env697	ATGAGCCAGCAACAGAAGAAACCG	Fw	5966-5989	<i>env</i>	2961	This work
env697	CTATTCTAACTCCACATATTCATT	Rv	8926-8903	<i>env</i>		This work

Sequence analysis and phylogenetic trees

Partial sequences from LTR and *gag* regions were aligned with the ClustalX and PHYLIP (Phylogeny Inference Package version 3.5c) programs and trees produced by the Neighbour Joining method with Kimura's correction, using 1000 bootstrap confidence limits. Results with over 500 bootstraps were considered highly likely.

Genbank sequence accession numbers are HQ864609-864616 for LTR partial sequences, HQ864599-864608 for *gag* partial sequences and HQ848062 for the 697 complete genome sequence.

Luciferase assay

A luciferase assay was used to comparatively analyse the LTR promoter activity of isolate 697 and other isolates. For this, LTR-luciferase plasmids were first constructed using proviral DNA from SF cultures infected with strains 697 (neuropathogenic; this study), 496 (arthritic; [12] or Kv1772 Icelandic neurological with an U3 repeat [10]. Three segments of the LTR region were amplified with primers specific for each of the strains under study: (1) U3, from the beginning of the U3 region to the TATA-box (negative control); (2) U3-CAP, from the beginning of the U3 region to the CAP site; (3) TATA-CAP, from the TATA-box to the CAP site (basal activity). Amplicons were purified with QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Primers included *XhoI* and *NcoI* restriction sites and amplicons were cloned in the pGL4.10[*luc2*] plasmid (Promega) using these restriction enzymes. All constructions were verified by sequencing.

For the luciferase assay, GSM cells (10^5 in 24-well plates) were transfected with 200 ng of each LTR construction using 4 μ l of LipofectamineTM Reagent (Life Technologies). Plasmids pGL4.13[*luc2*/SV40] and “empty” p-GL4.10[*luc2*] were used as positive and negative controls, respectively. At the same time, 50 ng of pGL4.73[*hRluc*/SV40] Vector (Promega) were cotransfected, so the firefly activity was standardized according to the *Renilla* luciferase activity. After 24 h, cells were harvested with Passive Lysis 5 \times Buffer (Promega), and firefly and *Renilla* luciferase activity were measured separately using Dual-GloTM Luciferase Assay System (Promega). Protein quantification in lysates was done with a colorimetric assay (Bio-Rad Protein Assay). Results were expressed as: U firefly luminescence/ U *Renilla* luminescence/ μ g of protein, and percentages against positive control (100%) were plotted (Fig. 2c).

Synthetic peptide ELISA and other ELISAs

Based on alignment using SU5 amino acid sequence deduced from 697 complete genome, other sequences of the outbreak and previously described sequences [22], a peptide was designed for use as coating antigen in an indirect ELISA aimed to identify infected animals of the neurological outbreak.

For the peptide design, hydrophilic regions of the SU sequence were predicted with the algorithms proposed by Hoop and Woods (1981) and Kyte and Doolittle [23], and the antigenic determinants with those of Kolaskar and Tongaonkar [24], using software ExpASY Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>). This peptide was named 98M (sequence VDMPQSYIEKQKRNK) and was synthesized by Thermo Scientific Co., using microwave synthesis technology [25].

For the 98M peptide-ELISA, 96-well microplates (Nunc) were coated with 300 ng of 98M peptide in carbonate buffer (pH 9.6) or carbonate buffer as negative control. Plates were allowed to dry overnight at 37°C and then blocked with 2.5% bovine casein for 1 h at 37°C. After five washes with PBS with 0.1% Tween 20, serum

samples were diluted 1/20 in PBS containing 1.25% bovine casein and incubated for 1 h at 37°C. Subsequently, protein G (0.2 µg/ml) diluted in the same buffer was added and plates incubated for 1 h at 37°C. After a final washing step, the reaction was developed using ABTS and plates were read at 405 nm. Net absorbance was obtained by subtracting the absorbance in the well without antigen from the absorbance of the well with antigen. The cut-off value was defined as three times the standard deviation of the absorbance values obtained in the group of negative sera (n=100).

To verify the infection status of sheep, two available ELISAs were used following the corresponding manufacturer's instructions: Elitest (Elitest-MVV Hyphen-Biomed, France) based on p25 recombinant and TM synthetic peptide antigens; and Chekit (AG-CHEKIT CAEV / MVV kit, IDEXX Switzerland) based on whole virus antigen.

RESULTS

Serological, pathological and immunohistochemical analysis of clinically affected sheep from the neurological outbreak

The eight animals studied at necropsy were found infected (according to Elitest) and had non purulent myelitis, characterized by wedge-shaped areas of demyelination in the white matter, with mononuclear perivascular cuffs and infiltration of gitter cells in the neuropile. In three animals (Nos. 336, 368 and 698), lesions appeared also in the brain, with severity similar to or lower than that found in the spinal cord lesions. The animals, except No. 368, showed also mild-to-moderate microscopic lesions characteristic of Visna/Maedi in lung and or mammary gland. Immunohistochemical labelling of spinal cord samples, where lesions were the most severe, revealed the presence of viral antigen (p27 and gp130) in the cytoplasm of few cells morphologically consistent with macrophages and always related to the lesions (Fig. 1).

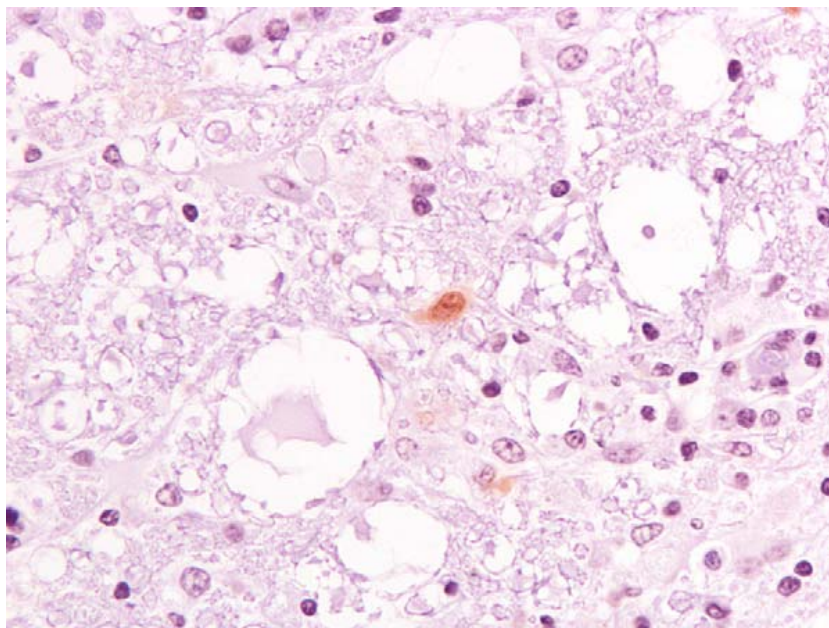


Fig. 1. Immunohistochemical preparation of spinal cord from sheep 697 with neurological (visna) macroscopic clinical signs. A positive immunohistochemical labelling (brownish-golden pigment) of a mononuclear cell morphologically compatible with a macrophage or reactive microglial cell is shown, as previously described antibodies against p27 and gp130 (Gelmetti et al., 2000). The remaining cells are distributed as a diffuse mononuclear inflammatory infiltrate of the neuropil. 400×.

Viral isolate from the neurological outbreak: in vitro properties and phenotype

Once demonstrated the presence of SRLV-related signs within the CNS, a representative strain of the outbreak was successfully isolated upon a two-week in vitro culture of the affected spinal cord from animal 697, a stage in which culture supernatants presented RT activity and had infectious properties. Viral genetic amplification by PCR using cells infected with these supernatants and amplicon sequencing allowed the identification of the new neuropathogenic isolate, named 697 hereafter.

This new isolate was used to infect different ovine (BDM and skin fibroblasts) and caprine cells (GSM-T LacZ cells) in order to comparatively study the phenotype according to in vitro replication measured by RT activity of culture supernatants post-inoculation. By one week post-inoculation, RT activity when using isolate 697 became high (≥ 2.68 mean ± 0.28 s.d.) and stable in BDM but it was low in GSM-T cells (Fig. 2a)

and also decreased progressively after each passage in fibroblast cultures, reaching low levels in SF ($\leq 0.33 \pm 0.25$ s.d.; $P < 0.05$ vs. BDM using Mann-Whitney's test). In contrast, strains Ev1 and Ov496 yielded similarly high RT activity values in GSM-T cells (Fig. 2a) and maintained high levels in BDM ($\leq 2.68 \pm 0.51$ s.d.) and fibroblast-like cells ($\leq 2.98 \pm 0.33$ s.d.) upon subculture.

In order to assess whether the diminished RT activity in 697-infected fibroblasts was due to diminished transcription, GSM-T lacZ cells were infected with 697 or the highly pathogenic CAEV-like ovine isolate (Ov496) and stained with X-gal to detect Rev production (number of stained cells) at different days post-inoculation (Fig. 2b). Although the assay is qualitative, it distinguishes between normal vs. highly diminished levels of Rev production. These levels were normal upon infection with 697 and Ov496 strains at different time points, leading within a week (5-10 days) to the appearance of small (with 4-10 nuclei, from the 8th day on) and large syncytia, respectively (Fig 2b). Thus, it appeared that Rev transcription levels of 697-infected fibroblasts could not explain the observed diminished RT-activity of this isolate.

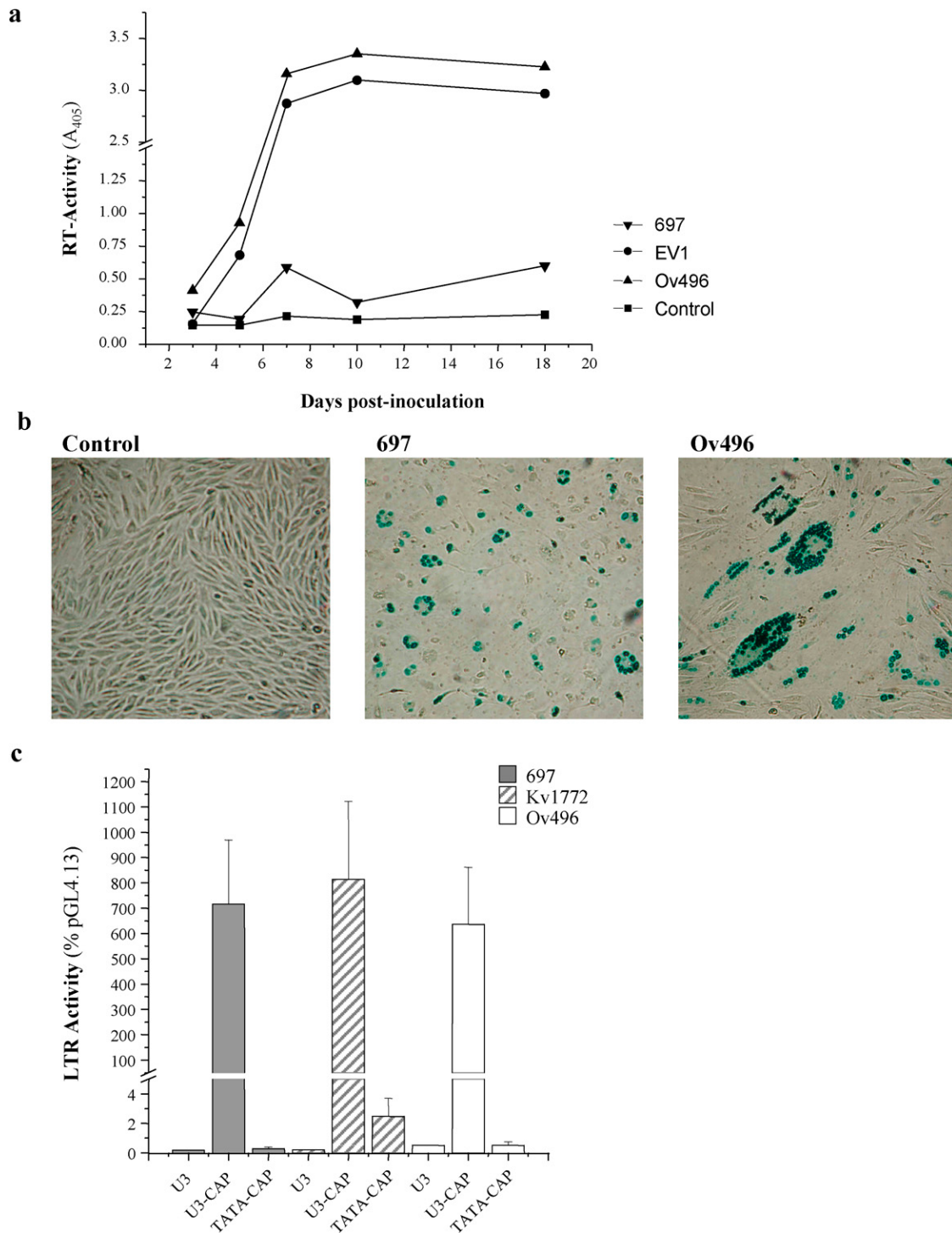


Fig. 2. Comparative study between isolate 697 and other small ruminant lentivirus strains on RT activity of GSM-T cells; syncytium formation in these cells and Rev protein production in these cells, as detected by X-gal staining; and promoter activity of the LTR U3 region. **(a)** RT activity (A_{405}) in culture supernatants of GSM-T cells inoculated with 100 TCID₅₀ of different SRLV strains. Supernatants were collected on days 3, 5, 7, 10 and 18 post-inoculation. Strains used: EV1, 496 and 697. Culture medium (DMEM) with 10% bovine fetal serum and 1% antibiotic was used as negative control; **(b)** Syncytium production and LTR activity of strain 697. **(c)** X-gal staining of infected cells and syncytia after 8 days of inoculation with 697 (medium panel) or Ov496 (right panel) strains of GSM-T lacZ cell cultures. Uninfected culture

is included as control (left panel); **c)** Promoter activity of the LTR U3 region of strains 697, Kv1772 and Ov496. Results are expressed as U firefly luminescence/ U *Renilla* luminescence/ µg of protein, percentages being plotted against the positive control (pGL4.13).

Viral sequence amplification and phylogenetic analysis in the clinical outbreak

In order to characterize the sequences of the circulating virus within the outbreak, we carried out a comparative study including the sequence of isolate 697 and those from other animals of the outbreak. Blood and tissue SRLV partial sequences obtained (Table 2) from the animals under study were quite homogenous, the maximal differences between sequences being 19.4% and 16.4% for the *gag* and LTR regions analysed, respectively. Sequences always clustered with those of typical VMV-like genotype A strains, using either 1.2 Kb *pol* or 1.8 Kb *gag-pol* sequences (Shah et al., 2004) (results not shown). Isolate 697 was of genotype A, clustering with other A isolates, either from the Iberian peninsula (Spain and Portugal), independently of the host (goat vs. sheep) and geographic proximity within this area (West vs. East coast), or from other origins. Assignment to a specific subgroup was unclear since similarity values located this isolate intermingled between A2 and A3 in line with previous findings on the proximity of A2 and A3 subtypes [5]. Thus the isolate 697 was assigned to the A2/A3 subtype.

Table 2. Proviral detection by PCR

PCR results on partial LTR (about 300 nt) and *gag* (about 490 nt) regions in different tissue samples (spinal cord, SC; choroid plexus, CPx; mammary gland, MG; lung, L; peripheral blood mononuclear cells, PBMC; and bronchoalveolar lavage cells, BAL) from eight adult ovine showing clinical Visna.

	SC		CPx		MG		L		PBMC		BAL	
	LT	Ga	LT	Ga	LT	Ga	LT	Ga	LT	Ga	LT	Ga
	R	g	R	g	R	g	R	g	R	g	R	g
160	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
166	+	+	+	+	nt	nt	+	+	+	+	+	+
292	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
336	+	+	-	-	-	+	-	-	nt	nt	nt	nt
358	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	nt	nt
368	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	nt	nt
697	-	+	nt	nt	-	+	-	+	-	+	nt	nt
698	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	nt	nt

In line with these results, the complete genome sequence of strain 697 clustered with known A VMV-like full genome sequences (Fig 3), the main differences being located in the hypervariable region of the *env* gene. The most heterogeneous region corresponded to V4-V5 ENV protein domains (Fig 4), previously proposed as targets for serological diagnosis [22]. The hypervariable region 1 of *env* (HV1) was highly conserved among SRLV strains and the hypervariable region 2 (HV2) was heterogeneous. Regarding a known antigenic site of the transmembrane protein (TM), isolate 697 presented the QH amino acid sequence like all the known VMV-like strains, rather than the HQ sequence present in CAEV-like isolates [12].

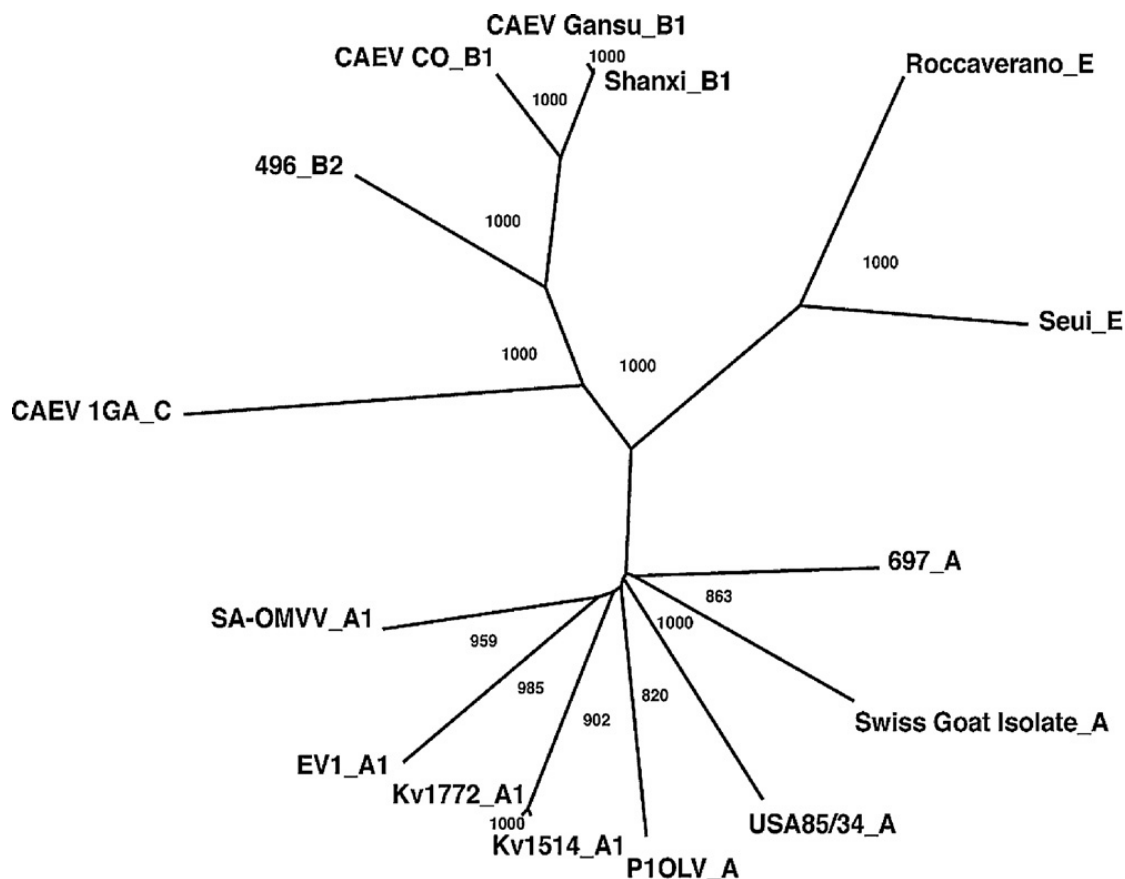


Fig. 3. Phylogenetic tree involving the full genome of 697 and GenBank SRLV sequences. Genotypes A, B1, B2, C and E are indicated at the end of the name of each strain. Bootstrap values are also indicated. The sequences included in the phylogram are: CAEV1GA (AF322109), Ov496 (FJ195346), CAEVCo/Cork (M33677), CAEV Gansu/1GA (AY900630), Shanxi (GU120138), Roccaverano (EU293537), Seui (GQ381130), Swiss Goat Isolate (AY445885, AY445886), USA85/34 (AY101611, U64439), P1OLV (AF479638), Kv1514 (M10608), Kv1772 (L06906), EV1 (S51392) and SAOMVV (M31646).

	HV1	HV2	HV5
697 (A2)	NITVG-NGT VTGNCS 480	CSAR---KKGRDLSLYI 585	YTYGVVDM PQSYIESQEKNKRS-KRSLQRRKRG 659
Kv1772 (A)I..... 483	.KS-----Q..... 583E.....M.A.GE...-R.N...K.- 656
1514 (A1)I..... 490	.A..TGR.GSQ..... 598E.....M.A.G..R...-R.N...K.- 671
SA-OMVV (A1)I..... 482	.A..NSK.--K..... 588KA.R.KNMR...TEI.RP.K.- 662
P1OLV (A)L..... 482	...V--GGTT..... 587KA.S---.K..Q-PQ..... 657
EV1 (A1)I..... 492	.A..AASRGNK..... 601	...E.....L.KNRR.---AFKKE.K.- 671
Cork (B1)I..... 451	.AP.Q--RD.KT..... 557IE..EN.AKTRII.RKKREL.HK.K.- 632
Ov496 (B2)I..... 456	.AP.W--RG.MS..... 562	...MI...S.HNQR--STR.KRELGHR.K... 636
CAEV-63 (B1)	...DR.Q.I..... 449	.AP.Q--RE.KT..... 555IE..EN.AKTRII.R.KREL.HT.K.- 630
Roccav (E1)	...LD-AQG.I.... 404	.KP.Q--RGN.T.V... 517IE..TG.ETPTIRRR.R-ETRSK.K... 591
Seui (E2)	...I.-.N..I.... 419	.KP.T--E.KT..... 532E...AE.A.PSRRR.KR-DT..A.K... 606
1GA (C)	ATQI.-.S.LQ.Q.N 396	-----NGARHY 480I...DN.ETLPGRRR.D--LAKA.K.- 552

Fig. 4. Alignment of deduced amino acid sequences of HV1, HV2 and HV5 regions (highlighted in grey) of the ENV protein from SRLV isolates. Sequences are aligned against 697 isolate (top). Dots indicate identity with 697 and dashes represent gaps. Accession numbers are M60855 for CAEV-63 and those indicated in Fig.3 caption.

The similarity in the complete Gag protein between strain 697 and VMV-like prototypes was very high (89-92%), maintaining the previously described antigenic sites [26-28].

Remarkably, there was a low similarity between the 697 Vif protein and VMV-like prototypes (61-68%) or CAEV-like strains (49-52%). The ELOC binding motif of the SRLV Vif protein, capable to interact with APOBEC3 for its degradation [29], presented in isolate 697 the sequence SLQRLT, slightly different from the consensus sequence (S/T LQ Y/R LA).

LTR sequence alignment of strain 697 with VMV-like and CAEV-like prototype sequences revealed the absence of a U3 repeat from the 697 genome, a repeat present in SRLV strains such as Kv1772 (43 nt repeat; Accession No. L06906), Ev1 (45 nt repeat; Accession No. S51392), SA-OMVV (42 nt repeat; Accession No. M31646), Gansu (54 nt repeat; Accession No. AY900630) or CAEV-Co (73 nt repeat; Accession No. M33677).

The lack of this repeat resulted in a reduction of potential transcription factor binding sites [2 AP-1 and one AML(vis) sites compared to Kv1772 strain]. Furthermore, the CAAAT box, located in all the ovine strains around nucleotide 130 of the U3 region and located between the AP-1 and AML(vis) sites, was also missing from strain 697 genome. Instead, this genome had a CAAAT box, downstream the TATA box, a location not described previously.

LTR promoter activity

Knowing that the strain involved in the neurological outbreak under study was able to induce disease signs in a high proportion of animals even at an early age, but did not present the U3 repeat and had a phenotype slow/low in fibroblast-like cells, we investigated which was the LTR promoter activity of isolate 697. For this, constructs U3, U3-CAP and TATA-CAP from three strains (697, Kv1772 and Ov496) were made and studied in relation to that of the SV40 promoter (plasmid pGL4.13) (Fig. 2c) by means of the luciferase assay, using GSM cells. The results indicated that the LTR promoter activities of the studied strains were not statistically different from

each other ($P > 0.05$ in Mann-Whitney's test; Fig 2c); and the promoter activity of the U3-CAP construct of the three strains involved in this assay (697, 496, and Kv1772 as U3-repeat control) was very high compared to that of SV40 promoter (positive control). In contrast, the activity of the TATA-CAP constructs and U3 constructs was basal in this cellular system (Fig 2c). Altogether, these results indicate that the LTR promoter activity of strain 697 (and others) involved the U3-CAP region (not the U3 or the TATA-CAP regions alone) and was not altered in this strain compared to others (for example, Kv1772).

Antibody based diagnostic test development

Once characterized genetically the virus involved in the neurological outbreak, we established the deduced amino acid sequences of viral GAG and ENV proteins and determined consensus sequences within the outbreak, in an attempt to develop a diagnostic tool that would help to detect the infections of the neurological outbreak and discriminate them from others, such as those of the arthritic outbreak. From these sequences, a consensus ENV SU peptide (No. 98M) of 15 amino acids was selected from a battery of synthetic peptides, then, it was synthesized and used as a coating antigen in an indirect ELISA developed for this study (Fig 5). Sera tested in this 98M peptide ELISA were from different flocks of two outbreaks, one of which included animals from the neurological outbreak with neurological disease ($n = 23$) and the other included animals suffering from SRLV arthritis ($n = 11$) (Fig 5). A group of seronegative animals ($n = 100$) included as control was used to determine the threshold value of the newly designed peptide 98M ELISA. In this ELISA, the proportion of positive animals was higher (Fisher's exact test; $P < 0.05$; Fig. 5) in animals affected by the neurological outbreak than in those affected by lentivirus-induced arthritis (100% vs. 9%, respectively). Altogether, these results indicate that the peptide 98M ELISA can be used, on one hand, to detect animals infected with the main viral strain involved in the outbreak (697-like) and, on the other hand, to discriminate between the infections of both Spanish outbreaks, neurological vs. arthritic.

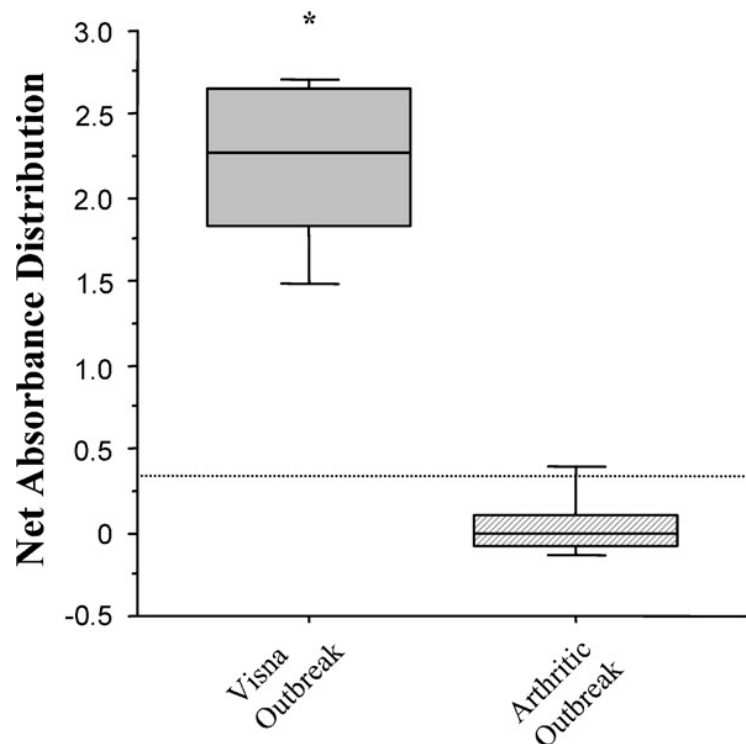


Fig. 5. Box plot of net absorbances obtained in the ELISA coated with 98M peptide of serum from the Visna outbreak (n= 23) and arthritic outbreak (n= 11) clinically affected animals. Discontinuous line: cut-off value (0.32). * P < 0.05 for differences between groups (Mann-Whitney test).

DISCUSSION

SRLVs have been characterized phylogenetically in different countries, but to understand the mechanisms involved in different clinical forms of the disease and to control the spread of virulent strains from outbreaks relevant to animal production and health, studies achieving viral isolation, genetic and biological characterization, virus genotyping and diagnostic tool development are needed. In the Spanish outbreak under study, isolation of the virus was achieved from the spinal cord of a sheep affected with the neurological form of the disease. This successful isolation was expected since all the animals studied showed severe lesions, even macroscopically evident, in the spinal cord, in agreement with previous reports on this outbreak [14-16]. Lesions were more severe in the spinal cord than in the brain.

PCR and RT activity in cell culture supernatants confirmed the capability of isolate 697 to induce a productive infection. This capability was high when using

BDM, which was compatible with histopathological findings showing the presence of macrophage-like cells having SRLV positive immunostaining in the CNS lesions (Fig. 1). However, the RT activity in culture supernatants of fibroblast-like cells infected with this isolate decreased gradually upon successive sub-culturing, likely due to inadaptation of this new isolate (697) to fibroblast in vitro culture conditions. These differences between both cell types (fibroblasts vs. BDM) in RT activity of culture supernatants may be explained by LTR promoter binding factors likely present in the BDM (which are major target cells; [30], but missing from fibroblasts.

However, the LTR promoter activity in isolate 697 (Fig. 2c) was normal, not diminished, in fibroblast-like cells compared to that of the Icelandic clone Kv1772 (yielded high RT activity in fibroblast culture supernatants), being in both cases higher than the SV40 basal promoter activity. Therefore, there appeared to be a sufficient number of transcriptional factors able to bind the 697 LTR in fibroblast-like cells, to ensure transcription. These observations are in line with recent observations indicating that the role of LTR in CAEV-infected goats is still unclear [31], suggesting that *env* or other viral sequences might be involved in tissue tropism and pathology.

The ENV protein has a major role in viral entry and determination of cellular tropism in HIV [32], FIV [33] and SRLV infections [34-36]. Taking into account the macrophage-tropic nature of SRLV, the virus of the outbreak under study could have colonized the CNS by carrier macrophages crossing the blood-brain barrier [37]. On the other hand, there may cells in the spinal cord permissive to ENV-mediated entry have supported the initial replication and amplification of the virus 697, as observed in spinal cord primary cultures.

Cellular restriction factors able to interact with viral proteins could account for the discrepancy between the relative extents of promoter activity (regular Rev production) and productive infection (decreased RT activity) in strain-697 infected fibroblast-like cells. Interestingly, Vif ELOC-motif [29] targeting cellular deaminase APOBEC3, which introduces deleterious mutations into viral genome, had a mutation in strain 697.

The complete genome of strain 697 was obtained by overlapping proviral amplicons. Thus, when analysing the *rev* sequence, the proviral DNA sequence obtained in this manner was very similar to the corresponding cDNA, suggesting that a “single main” provirus was analysed. Similarity analysis of partial LTR and *gag* sequences from animals within the outbreak indicated that isolate 697 was representative of the circulating strains since divergence was low. The outbreak viral sequences in BLAST studies, and the 697 sequence in the complete-genome phylogenetic analysis (Fig. 3) clustered with genotype A (A2/A3) reference strains, including Visna Icelandic ones, suggesting a relationship between viral genetic characteristics and induced pathology, as previously proposed [12]. Interestingly, 697 strain could not be associated clearly to a defined A subgroup. As described by Shah et al. (2004) differences between A2 and A3 are often not large enough to separate the 2 groups.

Serologically controlled flocks may still need further assessment [38, 39], due to antibody fluctuation, test sensitivity or antigen specificity. On the other hand, PCR needs to overcome genetic heterogeneity and low viral load issues. Thus, sensitive techniques based on local viruses and discriminatory antigens between SRLVs are still needed. The finding that in this study the most striking differences between isolate 697 and classical genotype A strains were located in the ENV SU5 region was relevant at the time of selecting a peptide for developing a diagnostic tool. This region is immunodominant, has a high variability, may help to detect the outbreak infection and may allow the genetic/antigenic classification of the infecting virus. Therefore, we produced a SU5 consensus-peptide 98M ELISA and tested it in two SRLV disease outbreaks within the North-Central region of Spain, differing in the clinical signs of the affected animals (neurological in Castilla y León vs. arthritic in Aragón) and infecting viruses (type A in Castilla y León vs. B in Aragón). Peptide 98M ELISA detected specifically all the neurologically affected sheep from the neurological outbreak tested and only one of the 11 arthritic sheep, suggesting the use of this ELISA as a discriminatory diagnostic tool. Furthermore, a high proportion (but not all) of the animals seropositive by peptide 98M ELISA was also seropositive by both

commercial ELISA (ELITEST and Chekit; data not shown). Altogether, these observations suggest that the peptide 98M ELISA represents a useful tool to identify possible carriers of the highly neuropathogenic strain (697-like) in the outbreak, and to control deleterious introductions of this strain into other flocks. Further studies are needed in order to determine the performance of this new peptide ELISA in different geographic areas, where different tools may be needed to overcome diagnostic deficiencies attributed to the high genetic and antigenic heterogeneity of SRLV infections.

CONCLUSIONS

Altogether, our results are compatible with previous findings claiming that, apart from the LTR, other viral and/or cellular sequences are involved in tropism; and also with observations suggesting a relationship between viral genetic characteristics and induced pathology (in this work, VMV-like genotype and neurological form). The diagnostic tool developed, the 98M peptide ELISA, is able to identify animals clinically infected with the VMV-like strain of the outbreak, suggesting that this tool may be useful to control the spread of this highly neuropathogenic virus to other flocks.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The experimental results and PCR and ELISA designs and procedures shown in this paper, including newly characterized nucleotidic and amino acid sequences, are included in a patent application.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge Dr. Ignacio J. Encío (Public University of Navarra) for his help on luciferase assay.

This study was supported by grants from Spanish CICYT (AGL2006-13410-C06-01/GAN; AGL2010-22341-C04-01), and Government of Navarra, Department of Agriculture (2003-2005). I. Galaria was supported by a predoctoral fellowship from the

Public University of Navarra. R. Reina was supported by a JAE-Post contract from the Spanish CSIC.

REFERENCES

1. Gjerset B, Rimstad E, Teige J, Soetaert K, Jonassen CM (2009) Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections. *Vet Microbiol* 135: 231-238.
2. Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, et al. (2007) Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J Gen Virol* 88: 3423-3427.
3. Reina R, Bertolotti L, Dei Giudici S, Puggioni G, Ponti N, et al. (2010) Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet Microbiol* 144: 24-31.
4. Reina R, Mora MI, Glaria I, Garcia I, Solano C, et al. (2006) Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res* 121: 189-198.
5. Shah C, Boni J, Huder JB, Vogt HR, Muhlherr J, et al. (2004) Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology* 319: 12-26.
6. Petursson G, Nathanson N, Georgsson G, Panitch H, Palsson PA (1976) Pathogenesis of visna. I. Sequential virologic, serologic, and pathologic studies. *Lab Invest* 35: 402-412.
7. Torsteinsdottir S, Agnarsdottir G, Matthiasdottir S, Rafnar B, Andresdottir V, et al. (1997) In vivo and in vitro infection with two different molecular clones of visna virus. *Virology* 229: 370-380.
8. Andresson OS, Elser JE, Tobin GJ, Greenwood JD, Gonda MA, et al. (1993) Nucleotide sequence and biological properties of a pathogenic proviral molecular clone of neurovirulent visna virus. *Virology* 193: 89-105.
9. Georgsson G (1989) Maedi Visna: Pathology and pathogenesis, development in Veterinary virology series. Yachiel Becker Kluwer academic Publ Boston: 19-53.
10. Oskarsson T, Hreggvidsdottir HS, Agnarsdottir G, Matthiasdottir S, Ogmundsdottir MH, et al. (2007) Duplicated sequence motif in the long terminal repeat of maedi-visna virus extends cell tropism and is associated with neurovirulence. *J Virol* 81: 4052-4057.
11. Christodoulopoulos G (2006) Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Ruminant Research* 62: 47-53.
12. Glaria I, Reina R, Crespo H, de Andres X, Ramirez H, et al. (2009) Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet Microbiol* 138: 156-162.
13. Angelopoulou K, Brellou GD, Greenland T, Vlemmas I (2006) A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus Res* 118: 178-184.
14. Benavides J, Garcia-Pariente C, Carmen Ferreras M, Fuertes M, Francisco Garcia-Marin J, et al. (2006) Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4- and 6-month-old lambs. *Vet J*.
15. Benavides J, Gomez N, Gelmetti D, Ferreras MC, Garcia-Pariente C, et al. (2006) Diagnosis of the nervous form of Maedi-Visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y Leon, Spain. *Vet Rec* 158: 230-235.
16. Benavides J, Garcia-Pariente C, Fuertes M, Ferreras MC, Garcia-Marin JF, et al. (2009) Maedi-visna: the meningoencephalitis in naturally occurring cases. *J Comp Pathol* 140: 1-11.
17. Carrozza ML, Mazzei M, Lacerenza D, Del Chiaro L, Giammarioli M, et al. (2009) Seroconversion against SU5 derived synthetic peptides in sheep experimentally infected with different SRLV genotypes. *Vet Microbiol* 137: 369-374.

18. Gelmetti D, Gibelli L, Brocchi E, Cammarata G (2000) Using a panel of monoclonal antibodies to detect Maedi virus (MV) in chronic pulmonary distress of sheep. *J Virol Methods* 88: 9-14.
19. Rolland M, Chauvineau C, Valas S, Mamoun RZ, Perrin G (2004) Establishment and characterization of a goat synovial membrane cell line susceptible to small ruminant lentivirus infection. *J Virol Methods* 118: 123-130.
20. Sargan DR, Bennet ID, Cousens C, Roy DJ, Blacklaws BA, et al. (1991) Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 8): 1893-1903.
21. Gjerset B, Storset AK, Rimstad E (2006) Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J Gen Virol* 87: 573-580.
22. Mordasini F, Vogt HR, Zahno ML, Maeschli A, Nenci C, et al. (2006) Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *J Clin Microbiol* 44: 981-991.
23. Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132.
24. Kolaskar AS, Tongaonkar PC (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276: 172-174.
25. Loupy A, editor (2006) *Microwaves in organic Synthesis*. Weinheim. 1007 p.
26. Lacerenza D, Genovese F, Profiti M, Nucera D, Rosati S (2008) Characterization of an immunodominant epitope of small ruminant lentivirus (SRLV) nucleoprotein. *Vet Immunol Immunopathol* 125: 361-367.
27. Grego E, Profiti M, Giammarioli M, Giannino L, Rutili D, et al. (2002) Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 828-832.
28. Grego E, Bertolotti L, Carrozza ML, Profiti M, Mazzei M, et al. (2005) Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Vet Microbiol* 106: 179-185.
29. Larue RS, Lengyel J, Jonsson SR, Andresdottir V, Harris RS (2010) Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. *J Virol* 84: 8193-8201.
30. Agnarsdottir G, Thorsteinsdottir H, Oskarsson T, Matthiasdottir S, Hafliadottir BS, et al. (2000) The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J Gen Virol* 81: 1901-1905.
31. 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: 177-184.
32. Power C, Johnson RT (2001) Neuroimmune and neurovirological aspects of human immunodeficiency virus infection. *Adv Virus Res* 56: 389-433.
33. Johnston JB, Power C (2002) Feline immunodeficiency virus xenoinfection: the role of chemokine receptors and envelope diversity. *J Virol* 76: 3626-3636.
34. Hotzel I, Cheevers WP (2001) Host range of small-ruminant lentivirus cytopathic variants determined with a selectable caprine arthritis- encephalitis virus pseudotype system. *J Virol* 75: 7384-7391.
35. Hotzel I, Cheevers WP (2005) Mutations increasing exposure of a receptor binding site epitope in the soluble and oligomeric forms of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus envelope glycoprotein. *Virology* 339: 261-272.
36. Hotzel I, Kumpula-McWhirter N, Cheevers WP (2002) Rapid evolution of two discrete regions of the caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface glycoprotein during persistent infection. *Virus Res* 84: 17-25.
37. Ivey NS, MacLean AG, Lackner AA (2009) Acquired immunodeficiency syndrome and the blood-brain barrier. *J Neurovirol* 15: 111-122.
38. Perez M, Biescas E, de Andres X, Leginagoikoa I, Salazar E, et al. (2009) Visna/maedi virus serology in sheep: survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragon (Spain). *Vet J* 186: 221-225.

39. van Maanen C, Brinkhof JM, Moll L, Colenbrander B, Houwers DJ (2010) Aspects of the epidemiology, research, and control of lentiviral infections of small ruminants and their relevance to Dutch sheep and goat farming. *Tijdschr Diergeneeskd* 135: 600-603.
40. Zanoni RG, Nauta IM, Kuhnert P, Pauli U, Pohl B, et al. (1992) Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet Microbiol* 33: 341-351.
41. Ryan S, Tiley L, McConnell I, Blacklaws B (2000) Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *J Virol* 74: 10096-10103.
42. Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, DeRock E, et al. (1993) Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res* 54: 1858-1862.

CHAPTER III

CHAPTER III

Alternative splicing derived truncated APOBEC3Z1 spliceoforms as a lentiviral restriction control mechanism

ABSTRACT

Intrinsic factors of the innate immune system include apolipoprotein B editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (APOBEC3) that inhibits viral replication by different mechanisms including cytosine deamination of viral DNA. Sheep contain three APOBEC3 (A3) genes encoding four proteins (A3Z1, Z2, Z3 and Z2-Z3) with yet not fully described antiviral properties. Using sheep blood monocytes and derived macrophages we report an inhibition of A3Z1 expression concomitant with viral replication burst. A3Z1 transcriptional analysis revealed the presence of spliced variants lacking cytidine deaminase motif (A3Z1Tr). Homologous (ovine skin fibroblasts) cells transfected with A3Z1 showed decreased viral production upon Small Ruminant Lentivirus infection compared with A3Z1Tr transfected cells, but signs of viral DNA editing were not evident. Equivalent A3 truncated spliceoforms were also present in human and monkey cells generalizing the presence of A3A spliced variants in primates. Overall A3Z1 viral restriction may be regulated by gene expression and stimulation of alternative splicing truncated forms lacking cytidine-deaminase motif.

Este artículo ha sido eliminado por restricciones de derechos de autor

PROYECTOS FUTUROS

PROYECTOS FUTUROS

Tropismo viral

En este trabajo se han estudiado los factores tanto del virus como los del hospedador implicados en el tropismo de los SRLV. Por un lado se han aislado y caracterizado dos estirpes circulantes en España pertenecientes a distintos genotipos de SRLV causantes de brotes epidemiológicos con diferentes patologías asociadas. Se aisló un virus tipo CAEV, del genotipo B2, procedente de un ovino de raza Rasa Aragonesa con afección artrítica, y por otro lado una estirpe tipo VMV, del genotipo A2/A3, en una oveja de raza Assaf con síntomas neurológicos. El análisis del genoma completo de ambas estirpes indica una posible asociación entre la secuencia nucleotídica y la forma clínica que presentan los animales infectados. Destacan dos regiones genómicas que podrían tener relación con el tropismo viral. La primera de ellas es la que corresponde a las proteínas de la envoltura viral, encargadas del reconocimiento del receptor celular y de la fusión y entrada de los viriones en las células.

Los pseudovirus son una buena herramienta para el estudio de las proteínas Env como determinantes del tropismo celular. En el laboratorio contamos con la estirpe CAEV-CO clonada en el plásmido pCAEV-AP que contiene todo el genoma viral exceptuando la envoltura junto con la fosfatasa alcalina (AP) humana (cedido por el Dr. Isidro Hötzel [1]). Así, co-transfectando células empaquetadoras 293T con este plásmido y con otro que contenga el gen *env*, se pueden producir virus pseudotipados con distintas envolturas que podrán utilizarse en ensayos de entrada en los que se transducen distintos tipos celulares, revelando la infección con el sustrato de la enzima AP. Se intentaron clonar las Env de las estirpes 496 y 697 en plásmidos de expresión eucariótica. La clonación de la secuencia de la *env* completa de la estirpe 496 resultó fallida a pesar de los múltiples intentos con plásmidos (pMDG, pN3, Topo, CNCR-HA y pCMVlcn) o bacterias (Top10, DH10B, XL1-Blue, JM109, DH5 α y HB). Ante la imposibilidad de clonar la *env* completa, se va a proceder a amplificar una secuencia más corta a la que le falta parte de la región TM, que es la zona tóxica de la proteína, aunque mantendría su funcionalidad [2] y con ello se realizarán los ensayos

de entrada que proporcionarán información sobre la implicación de Env en el tropismo. La secuencia *env* de 697 se ha clonado ya en el plásmido pCMVlcn de bajo número de copia transformando células JM109 (*recA*- y sin el sistema de restricción K de *E. coli*). Tras la transfección de fibroblastos con estos plásmidos se visualizaron sincitios a las 48 horas, indicando que la producción de las proteínas Env y el anclaje en la membrana plasmática de las células eran correctos. Además, las herramientas desarrolladas podrán utilizarse también en el estudio de receptores celulares para la entrada del virus [3].

A pesar de la tentadora asociación entre la capacidad para entrar en determinadas células, condicionada por la secuencia de las proteínas Env y el tropismo, otros factores virales podrían ser los responsables de dicho tropismo tisular, que provoca las distintas formas clínicas observadas en los dos brotes estudiados. Así, la segunda región genómica estudiada como responsable del tropismo se sitúa en las LTR. En la región U3 se han identificado sitios de unión a factores de transcripción esenciales para la replicación de los SRLV, así como sitios, que actúan como elementos *enhancer*, aumentándola bajo determinadas circunstancias. Se ha sugerido que la replicación viral depende de la disponibilidad de dichos factores de transcripción en los tipos celulares presentes en los diferentes tejidos diana de los SRLV [4,5]. Como elementos *enhancer*, los sitios TAS y GAS, relacionados con el desarrollo de lesiones artríticas favorecidas por la alta producción de TNF α e IFN γ en los procesos inflamatorios, no se han encontrado duplicados en la estirpe 496 causante de un brote importante de artritis en ovinos. La LTR de 697 carece también de la repetición en U3 presente en aislados nerviosos de Islandia, reduciendo el número de sitios de unión a factores de transcripción, lo que no parece disminuir su actividad transcripcional. Situaciones fisiológicas en las que se produce un cambio hormonal, por ejemplo el parto o la lactancia pueden también modificar la replicación viral por acción directa con la región LTR [6].

Los estudios llevados a cabo en esta tesis no sugieren que la región LTR sea responsable del tropismo ya que a pesar de mostrar una alta actividad transcripcional, la replicación de la estirpe 697 en fibroblastos ovinos es lenta y baja.

Sin embargo, es posible que la metodología empleada para la valorar la actividad transcripcional no sea la adecuada ya que el empleo de plásmidos podría no emular la situación natural, en la que otros factores como el empaquetamiento de la cromatina, el perfil de metilación de citosinas, etc., podrían influir en dicha actividad. Para evaluar de manera óptima la actividad transcripcional de los SRLV sería de interés generar vectores lentivirales de SRLV que inserten las diferentes construcciones del LTR diseñadas en el Capítulo II en el genoma celular y así valorar su actividad transcripcional.

Factores del hospedador

Es importante tener en cuenta que generalmente los animales afectados presentan más de una forma de la enfermedad, por ejemplo, en el brote artrítico del aislado 496, además de artritis las ovejas presentan afección pulmonar en un 54% y mamaria en un 77% [7]. El virus se detectó también en PBMCs y lavado broncoalveolar, pero nunca en muestras de cerebro. En el brote al que representa el aislado 697, el virus fue detectado con más frecuencia en muestras de médula espinal y pulmón, pero también se vieron afectados el plexo coroideo, mama, lavado broncoalveolar o PBMCs. La patología observada en ambos brotes parece estar en consonancia con el grupo filogenético al que se han asignado los virus infectantes: artrítica-genotipo B2-tipo CAEV y neurológica-genotipo A2/A3-tipo VMV, sin embargo las razas implicadas en sendos brotes son diferentes, Rasa Aragonesa en el artrítico y Assaf en el neurológico. Ensayos *in vivo* con estas dos estirpes y estas dos razas podrían demostrar la relación entre genotipo y clínica, o por el contrario dar peso a otros factores como la susceptibilidad de la raza, el manejo zootécnico, etc. En colaboración con el grupo del Dr. Lluís Luján (Universidad de Zaragoza) se han seleccionado ovinos de raza Rasa Aragonesa de ganaderías libres de SRLV acreditadas [8], verificados tanto por serología como por PCR, que se han infectado con ambas estirpes para averiguar si el hospedador puede determinar la patología inducida. Además se han empleado distintas vías de administración, intramedular e intratraqueal, con el fin de valorar el efecto de la vía de entrada en el desarrollo de la

sintomatología. Se estudiará la cinética de la infección (PCR y ELISA) durante toda la fase experimental. Para el análisis de la clínica, se está llevando a cabo un estudio anatomopatológico que, de manera preliminar, parece indicar que exista una relación directa entre el genotipo y la clínica observada, al menos en la infección con la estirpe 496.

Herramientas de diagnóstico

El conocimiento de las secuencias de las estirpes de SRLV, especialmente las que causan brotes epidemiológicos importantes, puede ayudar también a mejorar las herramientas diagnósticas disponibles. El uso de ELISAs para el control y erradicación de los SRLV basados en epitopos de una sola estirpe viral, los más abundantes actualmente en el comercio, puede dar lugar a falsos negativos que permitan escapes y la diseminación de virus no detectados, tal como se demuestra en la infección por los genotipos E [9], B2 [10], A [11] o A4 [12]. Probablemente el caso más alarmante es el de Reino Unido en el que se aplican medidas de control basadas en la detección temprana y eliminación de animales seropositivos (www.sheepandgoathealth.co.uk), donde se han detectado numerosos casos de seroconversión y de afección clínica [13,14]. El desarrollo de test serológicos locales permitiría un mejor control de la infección y además podría aportar información sobre la distribución geográfica real de un determinado brote. El alineamiento de la secuencia aminoacídica de los virus del brote nervioso junto con secuencias antes descritas [15] ha permitido seleccionar un péptido inmunogénico de la región hipervariable SU5 para el desarrollo de un ELISA indirecto, siendo buen candidato para el diagnóstico específico del brote neurológico y además permitiendo distinguir los virus de los dos brotes estudiados. Hemos explorado el uso de péptidos sintéticos de las regiones Env y Gag en comparación con ELISAs disponibles en el mercado (Elitest y Chekit), en una batería de sueros ovinos y caprinos incluyendo el brote artrítico, el brote nervioso, de otras regiones de España como Guipúzcoa, Vizcaya, Navarra o Teruel y sueros de otros países como Reino Unido, Islandia, Méjico, Italia, así como sueros negativos de ovinos y caprinos de Reino Unido, Islandia e Italia para determinar los valores umbral de los

ELISAs diseñados. Tal y como se describe en esta tesis, el péptido 98M es adecuado para detectar anticuerpos específicos del genotipo A, incluyendo sueros distintos al brote nervioso de Castilla y León, pero no del genotipo B. Así, el uso de los nuevos ELISAs basados en péptidos únicos podría ayudar al genotipado de las estirpes circulantes y su combinación con ELISAs estándares mejorar el diagnóstico y control de los SRLV [11].

Desarrollos posteriores basados en la combinación de péptidos sintéticos han permitido la detección temprana y específica de la infección experimental con las estirpes 496 y 697, tanto por la vía intramedular como por la intratraqueal, mejorando significativamente la sensibilidad de los tests disponibles en comercio. Además el uso individual de los péptidos permite el serotipado de la infección, haciendo de ellos una herramienta útil para el diagnóstico y control de los SRLV, ya que permitiría añadir péptidos de una manera rápida y a bajo coste para adecuar el test serológico a las estirpes circulantes en diferentes regiones. Este desarrollo ha sido recientemente transferido a la empresa Ingenasa ([16]; ES2387243).

Factores de restricción de la inmunidad innata

A pesar de que los virus aprovechan la maquinaria celular para completar su ciclo replicativo, existen proteínas celulares capaces de restringir o dificultar directamente el proceso de infección. Estas proteínas responsables de la restricción específica de especie de muchos virus, evitan así zoonosis y su estudio es particularmente interesante en el campo de los SRLV, capaces de transgredir dicha barrera entre ovinos y caprinos. TRIM5 α y APOBEC3 son los principales actores de la restricción específica de especie bloqueando diferentes pasos del ciclo viral. En concreto, hemos observado cómo la diferenciación de monocitos ovinos a macrófagos conlleva una disminución de la expresión de A3Z1 pero no de las moléculas A3Z2, A3Z3 y A3Z2Z3, al mismo tiempo que aumenta la replicación de los SRLV. Así mismo, macrófagos estimulados con IFN γ , resistentes a la infección, presentan una expresión de A3Z1 elevada mientras que en los estimulados con IL-4, permisivos a la infección, permanece baja. Muchos autores clasifican los tipos

celulares como permisivos o no permisivos a la infección por HIV- Δ Vif dependiendo de la expresión de las proteínas A3. Así, parece que el tropismo puede estar también condicionado por la presencia/ausencia de A3 eficientes a la hora de controlar la replicación viral. Hemos identificado en el desarrollo de esta tesis, isoformas derivadas de *splicing* alternativo de los transcritos de A3Z1 en ovinos, caprinos, rumiantes silvestres, monos y humanos. Resultaría interesante realizar una cuantificación de las variantes de *splicing* alternativo de A3Z1 en estas células, concretamente de la forma truncada A3Z1Tr que carece del dominio desaminasa. Con este fin hemos diseñado diferentes cebadores sentido en la zona del *splicing*, limitando el número de nucleótidos complementarios a la secuencia en dirección 3' (*downstream*) del *splicing*, pero todos ellos han amplificado de forma eficaz la isoforma entera de A3Z1 además de la isoforma truncada. Así, las PCRs diseñadas permiten la detección de A3Z1Tr, por visualización de un pico específico en la curva de disociación de los amplicones, pero no su cuantificación. El uso de sondas Taqman que proporcionan una mayor especificidad podría ayudarnos a superar esta dificultad.

La detección directa de las distintas isoformas de A3Z1 al nivel proteico por western blot (WB) nos podría aportar una información similar, pero no existen anticuerpos anti-A3 comerciales de la especie ovina. Para ello, hemos ya producido proteína A3Z1 recombinante con la que inmunizamos conejos para la obtención de un suero hiperinmune que nos servirá para identificar A3Z1 ovino y sus isoformas derivadas de *splicing*. Preliminarmente, los WB realizados sobre muestras de células 293T o CHO transfectadas con A3Z1, muestran una buena especificidad y sensibilidad. En estos momentos se está procediendo a la optimización del uso de este suero de conejo anti-A3Z1 en WB de muestras de macrófagos que permita una mejor comprensión de la expresión de las distintas isoformas de A3Z1 en distintas condiciones (IFN- γ , IL-4, infección con SRLV...).

Restricción heteróloga

La co-evolución hospedador-patógeno ha originado una fuerte selección positiva en las proteínas responsables de la restricción, evidenciando un “acomodamiento” a la infección lentiviral natural propia de la especie en consideración. La exposición de estos virus a los mismos factores procedentes de otras especies, y por lo tanto “acomodadas” a otros lentivirus, podría dar lugar a interacciones insólitas que tendrían éxito a la hora de restringir la replicación viral.

Los principales factores de restricción responsables de la existencia de la barrera de especie son TRIM5 α y APOBEC3. De hecho se han descrito múltiples casos de restricción heteróloga. Por ejemplo TRIM5 de mono rhesus restringe HIV-1 y TRIM5 de ovinos lo hace con HIV-2 [17,18].

El capítulo III de esta tesis muestra como APOBEC3Z1 es capaz de restringir la infectividad de HIV-2 pero no la de HIV-1 en comparación con el control EXN. Sin embargo, no hemos explorado aún la capacidad restrictiva de A3Z1 frente a otros tipos de virus como el de la Hepatitis B, Papilomavirus, Parvovirus, etc., sensibles a la actividad restrictiva de A3A humano.

Mejora en la producción y efectividad de vectores virales

Como se ha mostrado en el Capítulo III de esta tesis, los fibroblastos de piel ovinos que expresan A3Z1 (OSF-A3Z1) restringen SRLV y HIV-1 en comparación a células que expresan A3Z1Tr o células sin transfectar, pero no respecto al control de células transfectadas con el plásmido vacío (EXN). Se ha demostrado que tanto en monocitos primarios como en líneas celulares humanas, el DNA exógeno es reconocido y eliminado por la inducción de APOBEC3A mediante mecanismos desaminasa dependientes [19]. Hemos comprobado que los fibroblastos transfectados con un plásmido vacío muestran una sobreexpresión de las distintas moléculas A3, siendo la expresión de A3Z1 alrededor de 100 veces mayor respecto a fibroblastos sin transfectar, lo que explica la ausencia de diferencias significativas en la restricción. Así, según se ha demostrado *in vitro* [19] y recientemente *in vivo* [20],

la detección de DNA plasmídico induce una respuesta catabólica mediante la inducción de A3Z1, que conlleva a la eliminación del DNA entrante. Este mecanismo protector podría estar detrás de las bajas eficiencias alcanzadas por las estrategias que actualmente se emplean en la terapia génica. La terapia génica basada en vectores virales está experimentando un gran avance siendo su talón de Aquiles la baja eficiencia de producción y la escasa eficacia terapéutica. Nuestros resultados sugieren que células productoras de vectores virales que expresen isoformas truncadas de A3Z1 como A3Z1Tr, podrían disminuir la actividad desaminasa y por tanto incrementar los porcentajes de transfección y así mejorar la producción de vectores *in vitro*. Por otro lado, como muestran nuestros resultados de transducción, la susceptibilidad de las células para ser transducidas podría aumentar si se expresa A3Z1Tr y por tanto, mejorar la capacidad terapéutica de los vectores. La inhibición de la actividad de A3Z1 por parte de las isoformas derivadas de *splicing*, podría estar relacionada con la capacidad de las proteínas A3 de formar heterodímeros. Sin embargo, desconocemos si A3Z1Tr podría mediante este mecanismo unirse a las proteínas A3 nativas para modificar su actividad. Como se discute más adelante, esta hipótesis se está testando actualmente en el laboratorio. Tanto la reversión de la restricción como el aumento en la producción de vectores virales para terapia génica mediante el silenciamiento de A3Z1 sería una prueba inequívoca de la relación causa-efecto. Con este propósito, durante una estancia en el laboratorio del Dr. Yahia Chebloune (University Joseph Fourier, Grenoble, Francia), se procedió al diseño de siRNA (Small Interfering RNAs) y su clonación en el vector pSilencerTM 4.1-CMVneo con los que exploraremos esta posibilidad.

La restricción por A3Z1 podría no estar ligada a la actividad desaminasa de la enzima, ya que no se ha detectado edición en las secuencias virales a las 16 horas o 14 días tras la infección. Sin embargo, hemos encontrado indicios indirectos, como la amplificación diferencial utilizando enzimas Pfu sensibles o resistentes a la presencia de uracilo en la secuencia molde. La presencia de enzimas de reparación en la célula podría enmascarar el nivel de mutaciones presentes en el DNA viral. La uracil-DNA-glicosilasa (UNG) es una enzima de alta eficiencia capaz de escindir el uracilo presente

en el DNA originando mellas y su actividad podría estar enmascarando las mutaciones producidas por A3Z1. Es frecuente el uso de inhibidores de UNG para poder detectar DNA editado, como puede ser UGI, una proteína de un bacteriófago de *Bacillus subtilis* que inhibe N-glicosilasas de mamíferos [21]. Para evitar interpretaciones erróneas procederemos a secuenciar los amplicones virales empleando dichos inhibidores. Pretendemos también mediante 3D-PCR (*differential DNA denaturation-PCR*), explorar la presencia de mutaciones en el DNA viral. Amplicones con un elevado contenido en ATs necesitarían una temperatura menor de desnaturalización que amplicones con alto contenido en GCs. Además, mediante sondas TaqMan con la secuencia target de A3Z1 (TC), podremos cuantificar la actividad desaminasa en lisados celulares que expresen A3Z1 solo o en combinación con A3Z1Tr, que desaminarían la C, convirtiéndola en U, generando una mella en la sonda que produciría una rotura en la cadena de DNA, alejando el *quencher* del *reporter* lo que daría lugar a la emisión de fluorescencia.

Mecanismos de restricción independientes de la actividad desaminasa

Por el momento, hemos determinado que en los virus purificados por centrifugación en un gradiente de cesio, producidos en los sobrenadantes de OSF o 293T que expresan A3Z1, se detecta HA por WB indicando que A3Z1 se encapsida en los viriones y podría ejercer su actividad en las nuevas células infectadas (*passenger*). Además, podrían ser las moléculas de las propias células diana las que restringen el virus (cellular). La producción de pseudovirus en células 293T que expresen A3Z1 y la posterior transducción de fibroblastos normales aportarán también información a este respecto.

La existencia de interacciones proteína-proteína entre A3Z1 y A3Z1Tr podría aportar pruebas de la regulación de A3Z1 por medio de las isoformas truncadas. Existen estudios en A3 humanos que demuestran su capacidad para formar heterodímeros [22,23]. Sin embargo, desconocemos si A3Z1 o las isoformas derivadas de *splicing* en A3A humano son también capaces de formar dichos heterodímeros, así como el significado biológico de dicha interacción. Resultados preliminares de

coimmunoprecipitación con A3Z1 y A3Z1Tr etiquetadas con HA y Flag respectivamente, evidencian dicha interacción. Además, la expresión de la proteína nativa se induce a mayores niveles cuando se co-expresa con A3Z1Tr. El mecanismo podría semejar a la dominancia negativa que ejercen algunas isoformas derivadas de *splicing* de TRIM5 sobre TRIM5 α , como por ejemplo los presentes en células humanas [24]. Ensayos de coimmunoprecipitación extendidos a las proteínas A3Z2, A3Z3 y A3Z2Z3 parecen indicar que A3Z1Tr coimmunoprecipita también con otras proteínas A3, por lo que su expresión podría controlar el mecanismo de restricción de una manera más general. Se han identificado variantes de *splicing* alternativo semejantes a A3Z1Tr en muestras de caprinos, humanos y monos, indicando que la regulación de la restricción lentiviral mediante formas truncadas podría estar conservada en otras especies. Pretendemos profundizar en el estudio de A3A (homólogo humano de A3Z1) y su posible regulación por isoformas truncadas mediante ensayos similares a los planteados en ovino utilizando pseudovirus y virus HIV-1. Si, según las hipótesis planteadas, se demuestra que las isoformas truncadas pueden regular de manera negativa la expresión o actividad de A3A y otras proteínas A3 humanas, nos encontraríamos frente a una herramienta potencialmente válida para mejorar tanto la eficiencia de producción de vectores lentivirales como su capacidad de transducción en la aplicación terapéutica, ya que ayudaría a incrementar la transducción *ex vivo* de linfocitos primarios y otras células inmunes.

REFERENCIAS

1. Hotzel I, Cheevers W (2002) Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. *Virology* 301: 21-31.
2. Zeilfelder U, Bosch V (2001) Properties of wild-type, C-terminally truncated, and chimeric maedi-visna virus glycoprotein and putative pseudotyping of retroviral vector particles. *Journal of virology* 75: 548-555.
3. Crespo H, Bertolotti L, Juganaru M, Glaria I, Andres Dd, et al. (2013) Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet Res* 44: (26 September 2013).
4. Barros SC, Andresdottir V, Fevereiro M (2005) Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Arch Virol* 150: 201-213.
5. Oskarsson T, Hreggvidsdottir HS, Agnarsdottir G, Matthiasdottir S, Ogmundsdottir MH, et al. (2007) Duplicated sequence motif in the long terminal repeat of maedi-visna virus extends cell tropism and is associated with neurovirulence. *J Virol* 81: 4052-4057.

6. Gomez-Lucia E, Sanjosé L, Crespo O, Reina R, Glaria I, et al. (2014) Modulation of the long terminal repeat promoter activity of small ruminant lentiviruses by steroids. *Vet J*.
7. Perez M, Biescas E, Reina R, Glaria I, Marin B, et al. (2015) Small ruminant lentivirus-induced arthritis: clinicopathologic findings in sheep infected by a highly replicative SRLV B2 genotype. *Vet Pathol* 52: 132-139.
8. Perez M, Munoz JA, Biescas E, Salazar E, Bolea R, et al. (2013) Successful Visna/maedi control in a highly infected ovine dairy flock using serologic segregation and management strategies. *Preventive Veterinary Medicine* 112: 423-427.
9. Reina R, Grego E, Profiti M, Glaria I, Robino P, et al. (2009) Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Veterinary Microbiology* 138: 251-257.
10. Lacerenza D, Giammarioli M, Grego E, Marini C, Profiti M, et al. (2006) Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 112: 264-271.
11. de Andres X, Ramirez H, Bertolotti L, San Roman B, Glaria I, et al. (2013) An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152: 277-288.
12. Cardinaux L, Zahno ML, Deubelbeiss M, Zanoni R, Vogt HR, et al. (2013) Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Vet Microbiol* 162: 572-581.
13. Ritchie C, Hosie B (2014) Concern over maedi visna breakdowns. *Vet Rec* 175: 50-51.
14. Reports Na (2014) Animal health: Concern about 'out of sight, out of mind' attitude to maedi visna. *Veterinary Record* 174: 645
15. Mordasini F, Vogt HR, Zahno ML, Maeschli A, Nenci C, et al. (2006) Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *J Clin Microbiol* 44: 981-991.
16. Sanjose L, Pinczowski P, Crespo H, Perez M, Glaria I, et al. (2015) Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA. *Vet J* 204: 88-93.
17. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, et al. (2004) The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427: 848-853.
18. Jauregui P, Crespo H, Glaria I, Lujan L, Contreras A, et al. (2012) Ovine TRIM5 α can restrict visna/maedi virus. *J Virol* 86: 9504-9509.
19. Stenglein MD, Burns MB, Li M, Lengyel J, Harris RS (2010) APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol* 17: 222-229.
20. Kostrzak A, Henry M, Demoyen P, Wain-Hobson S, Vartanian J (2015) APOBEC3A catabolism of electroporated plasmid DNA in mouse muscle. *Gene therapy* 22: 96-103.
21. Kostrzak A, Henry M, Demoyen PL, Wain-Hobson S, Vartanian JP (2015) APOBEC3A catabolism of electroporated plasmid DNA in mouse muscle. *Gene Ther* 22: 96-103.
22. Dang Y, Wang X, Esselman WJ, Zheng YH (2006) Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol* 80: 10522-10533.
23. Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, Cullen BR (2004) A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *The EMBO journal* 23: 2451-2458.
24. Battivelli E, Migraine J, Lecossier D, Matsuoka S, Perez-Bercoff D, et al. (2011) Modulation of TRIM5 α activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms. *Journal of virology* 85: 7828-7835.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. **Sobre el aislamiento y la genética de la estirpe implicada en el brote de Aragón (artritis).**- Las secuencias de *gag* y LTR obtenidas de los animales del brote se encuentran filogenéticamente relacionadas entre sí, agrupándose en el genotipo B2 de SRLV. La estirpe 496, aislada de una oveja de raza Rasa Aragonesa con afección artrítica, es representativa del brote como indica la semejanza genética. El genoma completo de la estirpe 496 es de tipo CAEV, lo que sugiere una asociación entre la secuencia de las estirpes infectantes y el desarrollo de formas de la enfermedad concretas. Sin embargo, el dominio de unión a DNA de la integrasa es tipo VMV, lo que sugiere una adaptación a la especie ovina. La región LTR carece de repetición y presenta delección en la región R, aunque conserva los motivos GAS, TAS, el sitio AP-4, la caja TATA y la señal poly-A, confirmando que son sitios esenciales para la replicación viral.
2. **Sobre el aislamiento y la genética de la estirpe implicada en el brote de Castilla-León (encefalitis).**- Las secuencias parciales de *gag* y LTR de los animales del brote nervioso presentan una alta similitud entre ellas y con la estirpe 697, aislada de un ovino de raza Assaf con lesiones medulares severas. El genoma completo se agrupa en el genotipo A, en el que se agrupan otras estirpes neurotrópicas, sugiriendo de nuevo una relación entre las características genéticas y la patología inducida.
3. **Sobre la caracterización biológica de las estirpes 496 y 697 *in vitro*.**- La estirpe 496 produce un gran efecto citopático y un elevado título en el sobrenadante de células en cultivo en consonancia con la infección natural en ovinos. La adaptación al hospedador ovino y la cinética viral podrían tener relación con la presencia de una Integrasa de tipo VMV. El aislado 697 muestra una buena producción en macrófagos derivados sangre, compatible con la presencia de células tipo macrófago en las lesiones, pero baja en fibroblastos derivados de piel. La actividad promotora de la región LTR, que carece de la repetición presente en otros aislados causantes de encefalitis es

alta, indicando una adecuada distribución de factores de transcripción. Todo ello apunta a que la región LTR por sí sola no es determinante del tropismo celular.

4. **Sobre el desarrollo de métodos diagnósticos que permitan identificar las infecciones en ambos brotes.-** Las diferencias encontradas en las secuencias SU5 y TM de ambos brotes permiten el diseño de herramientas diagnósticas específicas. El péptido 98M es buen candidato para detectar específicamente sueros procedentes del brote neurológico. El ELISA tapizado con el péptido 98M permite detectar de manera específica animales con afección nerviosa y discriminar los animales con clínica artrítica, convirtiéndolo en una buena herramienta para el diagnóstico y control del brote.
5. **Sobre la cuantificación de la expresión de las proteínas APOBEC3 ovinas.-** La maduración de monocitos derivados de sangre periférica a macrófagos conlleva una disminución de la expresión de APOBEC3Z1, pero no de APOBEC3Z2, Z3 o Z2Z3, sugiriendo que esta molécula podría estar implicada en la permisividad a la infección por SRLV en macrófagos. Los macrófagos estimulados con IFN- γ , resistentes a la infección por SRLV, expresan altas cantidades de APOBEC3Z1. En cambio, los macrófagos estimulados con IL-4, permisivos a la infección, presentan una baja expresión de APOBEC3Z1.
6. **Sobre la identificación de variantes de *splicing* alternativo en APOBEC3Z1 de ovinos y caprinos.-** El análisis de transcritos de APOBEC3Z1 revela la existencia de variantes de *splicing* alternativo, siendo la más numerosa una isoforma que carece del dominio desaminasa completo, APOBEC3Z1 truncado (A3Z1Tr). Las muestras caprinas presentan además una isoforma que pierde el dominio desaminasa manteniendo el motivo de dedo de zinc, A3Z1Tr2 y una variante que se traduce en una proteína de 53 amino ácidos no identificada en las bases de datos, A3Z1Tr3.
7. **Sobre la restricción mediada por APOBEC3Z1 de SRLV.-** Los fibroblastos de piel ovina, permisivos a la infección por SRLV, adquieren resistencia al expresar APOBEC3Z1 respecto a células que expresan A3Z1Tr, tanto en lo

referente a la carga proviral como a la producción de virus. La restricción se observa a pesar de la presencia de la proteína viral Vif y muy probablemente de la actividad desaminasa. Sin embargo, no se puede descartar la actividad enzimática en la modulación de la infectividad viral.

8. **Sobre la restricción mediada por APOBEC3Z1 de lentivirus heterólogos (HIV).**- Fibroblastos que expresan APOBEC3Z1 inhiben la transducción de pseudovirus HIV-1 en comparación con células que expresan A3Z1Tr, pero no respecto a células transfectadas con plásmido control. En cambio, la infectividad de HIV-2 se reduce al expresar APOBEC3Z1 también respecto a células control transfectadas con plásmido vacío. La transfección con plásmidos de DNA aumenta la expresión endógena de A3Z1, por lo que no es adecuado para el estudio de la restricción. La restricción heteróloga descrita promueve el estudio del uso de APOBEC3Z1/A de especies distintas en la restricción del lentivirus natural infectante en un hospedador.
9. **Sobre la identificación de variables de *splicing* alternativo en APOBEC3A de humano y monos.**- Además de APOBEC3A completo, existen variables de *splicing* alternativo en PBMCs de humano y mono, equivalentes a las que hemos descrito en ovinos. El paralelismo entre esas isoformas y las descritas en ovinos generaliza el modelo a otras especies y justifica su estudio en relación con la infección por HIV-1.

