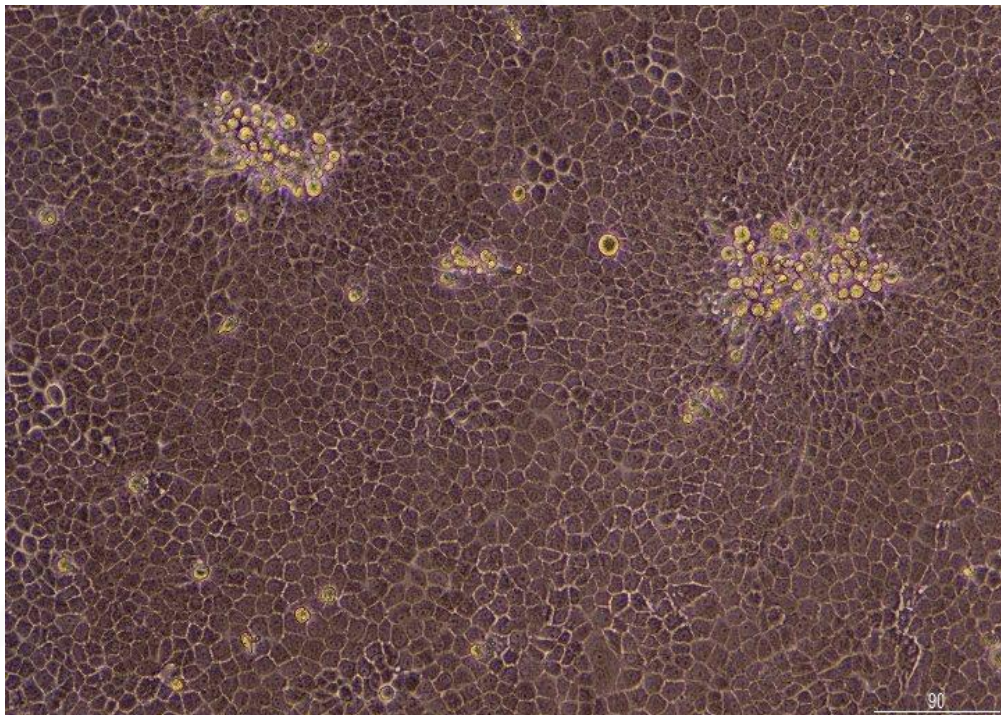


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

Salto de especie viral: Caracterización de cepas virales en relación con el tropismo celular.



Por Saúl Alcalá Pérez

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular/Universidad de Oviedo

Julio/2023



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



RESUMEN

El *mixoma virus* (MYXV) es un poxvirus que causa mixomatosis en conejos (*Oryctolagus cuniculus*), una enfermedad letal que se extendió por Australia y Europa durante el siglo XX. Recientemente ha ocurrido un salto de especie viral, es decir un cambio en el tropismo del virus, que ha provocado la aparición del ha-MYXV, causante de numerosos brotes de mixomatosis en liebres (*Lepus granatensis*). En este trabajo se investiga si unas cepas vacunales de MYXV (SG33, VMI30, León162), cepas naturalmente atenuadas de MYXV (4604 y 6918) y el virus del fibroma de Shope (VFS) tienen capacidad de replicación *in vitro* en células RK13 (conejo) y HN-R (liebre) y si en tal caso podrían emplearse como vacunas frente a la mixomatosis en liebre. Estas cepas de MYXV presentan mutaciones similares al ha-MYXV en los genes *M009L*, *M036L* y *M152R*, por lo que también se ha investigado si dichas mutaciones influyen en el cambio del tropismo del ha-MYXV. La replicación se ha determinado mediante la titulación viral y la cuantificación mediante qPCR del número de copias de genomas virales en células RK13 y HN-R 96 horas después de ser infectadas. Además, se ha analizado la expresión de genes virales tempranos y tardíos mediante RT-PCR para tratar de obtener información sobre su ciclo replicativo. Se ha observado la replicación de todas las cepas en células RK13, teniendo las cepas vacunales de MYXV una ventaja para replicar *in vitro* frente a las cepas atenuadas o VFS. Sin embargo, no hay evidencia de replicación en las células HN-R, por lo que los genes *M009L*, *M036L* y *M152R* no parecen otorgar una ventaja a la hora de infectar células de liebre. En consecuencia, estas cepas no son buenas candidatas para ser futuras vacunas contra ha-MYXV en liebres.

ABSTRACT

Myxoma virus (MYXV) is a poxvirus which causes myxomatosis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), a lethal disease which spread across Australia and Europe during the XX century. Recently there has been a viral species jump, which is a tropism change in the virus, that has caused the appearance of ha-MYXV, responsible for outbreaks of myxomatosis in hares (*Lepus granatensis*). In this study it was investigated whether some selected MYXV vaccine strains (SG33, VMI30 and León162), naturally attenuated strains of MYXV (4604 and 6918) and Shope Fibroma Virus (SFV) can replicate *in vitro* in RK13 (rabbit) and HN-R (hare) cells and if so they could be used as vaccines against myxomatosis in hares. These MYXV strains have some common mutations with ha-MYXV in the *M009L*, *M036L* and *M152R* genes, so if these mutations had an influence in the tropism change of ha-MYXV was also studied. Replication was determined by viral titration and quantification of viral genome copies by qPCR in RK13 and HN-R cells 96 hours after being infected. The expression of early and late viral genes using RT-PCR was also analyzed to obtain information on the virus replication cycle. All strains were able to replicate in RK13 cells, although MYXV vaccine strains showed higher replication *in vitro* than attenuated strains or SFV. No evidence of the replication of these strains in HN-R cells was observed, so the *M009L*, *M036L* and *M152R* genes don't seem to allow any advantage for replication in hare cells. As a result, these strains are not good candidates for future ha-MYXV vaccines in hares.



Índice

1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1 Características del <i>Myxoma virus</i>	- 1 -
1.2 La mixomatosis: antecedentes.....	- 2 -
1.3 Salto de especie del MYXV a la liebre (<i>Lepus granatensis</i>).....	- 4 -
1.4 Planteamiento experimental	- 6 -
1.5 Objetivos	- 7 -
2. METODOLOGÍA	- 7 -
2.1 Líneas celulares RK13 y HN-R y su mantenimiento	- 7 -
2.2 Titulación de virus	- 8 -
2.3 Replicación <i>in vitro</i> de virus en RK13 y HN-R.....	- 10 -
2.4 Cuantificación de genomas virales mediante qPCR.....	- 10 -
2.5 Análisis de expresión génica mediante RT-PCR y qPCR	- 12 -
3. RESULTADOS	- 12 -
3.1 Generación de stocks virales.....	- 12 -
3.2 Efecto citopático causado por los virus en células RK13 y HN-R	- 13 -
3.3 Comparación de títulos virales 96h post infección	- 16 -
3.4 Cuantificación de genomas virales presentes en las células RK13 y HN-R 96 h post infección mediante qPCR	- 17 -
3.5 Expresión génica analizada mediante RT-PCR y qPCR	- 19 -
4. DISCUSIÓN	- 21 -
5. CONCLUSIONES	- 25 -
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 25 -

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características del *Myxoma virus*

El *Myxoma virus* (MYXV) se trata de una especie viral del género *Leporipoxivirus*, de la subfamilia *Chordopoxvirinae* y familia *Poxviridae* (*Current ICTV Taxonomy Release* | ICTV, s. f.). El MYXV, al igual que otros poxvirus, posee un genoma lineal de ADN de doble cadena, con repeticiones terminales invertidas (ITR, siglas en inglés) y horquillas en sus extremos. Este genoma se compone de un total de 159 genes diferentes, de los cuales 12 se encuentran en doble copia en las ITR, dando un total de 171 genes. Estos genes se nombran desde el extremo izquierdo del genoma hacia la derecha, con la letra “M” seguida de 3 cifras (o 4 cuando se emplean cifras decimales) que indican su orden. Además, también se añade la dirección de transcripción del gen con las letras R, derecha, y L, izquierda (Cameron et al., 1999).

El ciclo replicativo de los poxvirus está conservado entre sus distintas especies (ver la Figura 1). Mientras que en otros virus el tropismo celular viene principalmente determinado por la presencia de receptores específicos a los que los virus se unen, los poxvirus parecen ser capaces de entrar en tanto células permisivas como restrictivas, pero las células restrictivas son capaces de interrumpir su ciclo replicativo y por tanto no son permisivas al virus. Por tanto, el tropismo está determinado por la incapacidad de interrumpir el ciclo del poxvirus, que varía entre linajes celulares y especies distintas (Revisión por McFadden, 2005).

Una vez dentro de la célula, la ARN polimerasa viral empieza a transcribir los genes bajo el control de promotores tempranos, pasando este ARNm al citoplasma a través de poros del *core* (Revisión por Broyles, 2003). El ARNm de los genes tempranos es traducido a proteínas que acaban por provocar la desorganización del *core* y la subsecuente liberación del ADN viral al citoplasma (ver Figura 1). A continuación, se inicia la replicación del ADN viral y se transcriben, consecutivamente, los genes regulados por promotores intermedios y promotores tardíos. La acumulación de productos tardíos conlleva el ensamblaje y morfogénesis de partículas virales (Revisión por McFadden, 2005).

Además de los genes requeridos para su replicación, el genoma del MYXV codifica numerosas proteínas con actividad inmunorreguladora, lo cual permite al virus bloquear las rutas antivirales de la célula y evadir al sistema inmunitario del animal infectado (Revisión por Stanford et al., 2007).

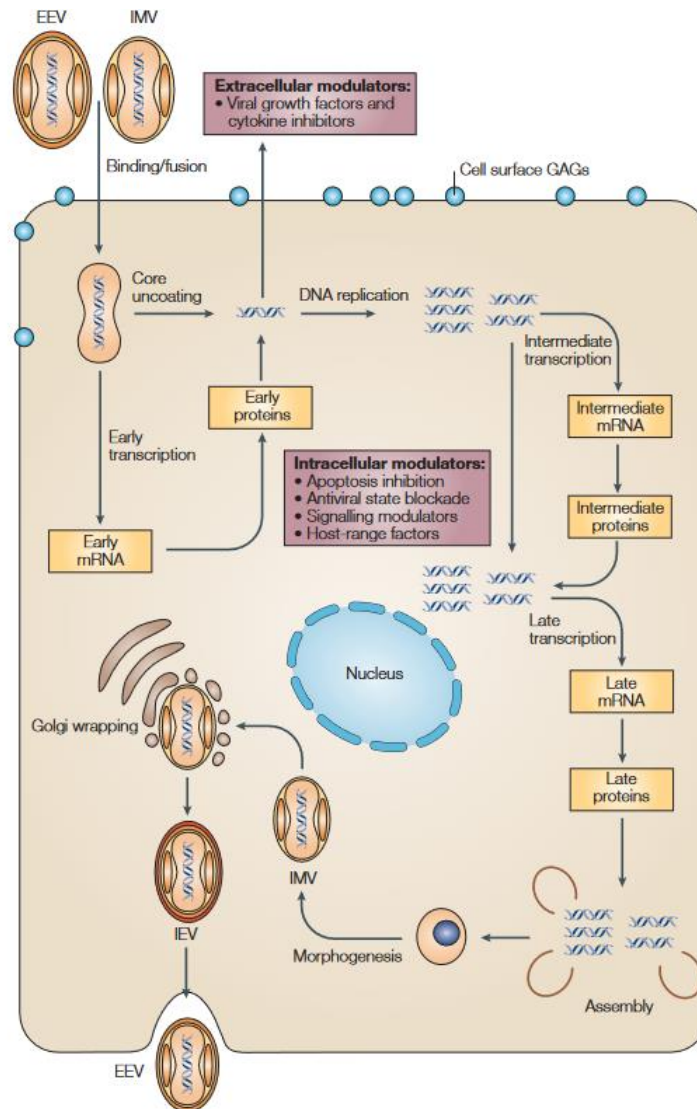


Figura 1. Ciclo replicativo de los poxvirus. Obtenido de (McFadden, 2005).

El huésped natural del MYXV es *Sylvilagus brasiliensis*, nativo de América del Sur, más comúnmente conocido como tapetí o conejo brasileño. Cuando el tapetí es infectado por MYXV, se genera un fibroma cutáneo, generalmente benigno, que desaparece pasadas unas semanas. El virus se transmite empleando como vector artrópodos como mosquitos y pulgas. Estos, al picar en el fibroma, entran en contacto con una gran carga viral, pudiendo infectar a otros individuos de manera pasiva al picarlos (F. Fenner & Ratcliffe, 1965; Revisión por Kerr, 2012).

1.2 La mixomatosis: antecedentes

Aunque su huésped natural fuese el tapetí, en 1896 tuvo lugar en un laboratorio de conejos en Montevideo (Uruguay) una infección de *Oryctolagus cuniculus* (conejo europeo) por MYXV, produciendo una enfermedad letal que fue denominada mixomatosis. Los efectos y

severidad varían según la raza del conejo y de la cepa viral, pero algunos síntomas comunes son lesiones y tumores cutáneos (mixomas), hinchazón y secreción mucosa purulenta en párpados y orejas, blefaroconjuntivitis (ver Figura 2) y edema anogenital (Kerr et al., 2015). Además, es común que el huésped termine desarrollando infecciones bacterianas en la mucosa nasal, la conjuntiva y el tracto respiratorio, a causa de la inmunodeficiencia generada por el virus (Mossman et al., 1996).



Figura 2. Síntomas comunes de mixomatosis. Obtenido de: <https://www.uab.cat/web/detalle-noticia/luchar-contra-la-mixomatosis-1345680342040.html?articleId=1278396863819>

En 1950 una cepa de MYXV, la *Standard Laboratory Strain* (SLS), fue puesta a prueba como agente biológico para controlar la población del conejo europeo en Australia (Kerr, 2012), lo cual dio comienzo a una epidemia de mixomatosis que rápidamente se extendió por el sudeste australiano (Myers, 1954).

Estos brotes fueron de una mortalidad mayor al 95% en la mayoría de las regiones, aunque en otras la mortalidad fue mucho menor de lo esperado. Además, la mixomatosis se extendió también al norte australiano, pero avanzó más lentamente en esas zonas (F. Fenner et al., 1953). Una situación similar ocurrió en Francia, cuando se liberó la cepa de MYXV Lausanne en 1952 en la región de París, la cual se extendió a lo largo de Francia y Europa en los años siguientes (Arthur & Louzis, 1988; Giban et al., 1956).



Con el paso del tiempo se produjo una selección de cepas atenuadas menos virulentas debido a varios factores (F. J. Fenner, 1983). Tuvo lugar un incremento de la resistencia genética de los conejos, es decir, hubo una selección de conejos más resistentes al virus, además del aumento de las temperaturas, que dificulta su expansión, o la inmunización pasiva de crías de madres que ya han sufrido la enfermedad y que por tanto estaban inmunizadas (F. Fenner & Marshall, 1954; Revisión por Kerr, 2012; Marshall, 1959). Las cepas de MYXV se clasifican en 5 grados de virulencia, presentados en la Tabla 1, siendo el grado A (o I) el de mayor virulencia y el grado E (o V) de las cepas más atenuadas (Bárcena et al., 2000; F. Fenner & Marshall, 1957). Entre las cepas del grado E se encuentran algunas cepas vacunales.

Tabla 1. Grado de virulencia de las cepas de MYXV. La clasificación en grados de A a E (Bárcena et al., 2000) es una adaptación de la clasificación de (F. Fenner & Marshall, 1957), pero son equivalentes.

GRADO	A (I)	B (II)	C (III)	D (IV)	E (V)
VIRULENCIA	Muy alta	Alta	Moderada	Baja	Muy baja
RATIO DE MORTALIDAD-CASO	99,5%	99%	90%	60-70%	0-30%
TIEMPO DE SUPERVIVENCIA MEDIO	Menos de 13 días	Entre 13 y 16 días	Entre 16 y 28 días	Entre 28 y 50 días	-

1.3 Salto de especie del MYXV a la liebre (*Lepus granatensis*)

El MYXV se trata de un virus de tropismo muy específico, de manera que solo causa la enfermedad a unas especies concretas (Revisión por McFadden, 2005). Se habían reportado previamente casos de infección de liebres europeas (*Lepus Europaeus*) por MYXV, pero eran escasos y distanciados en el tiempo (Barlow et al., 2014). Por ello resultó sorprendente como en 2018 apareció en España y Portugal un virus de mixoma recombinante natural, denominado ha-MYXV o MYXV-Tol, capaz de infectar a la liebre ibérica (*Lepus granatensis*) y causar la mixomatosis en esta especie (Dalton et al., 2019). La aparición de estos brotes de mixomatosis en liebres implica que ha ocurrido un salto de especie viral, es decir, que ha habido un cambio en el tropismo del virus. Aunque inicialmente se detectó en liebres, en 2020 se registraron casos de conejos infectados con ha-MYXV (Abade dos Santos et al., 2021).

Al comparar el genoma del ha-MYXV con la cepa de MYXV de referencia Lausanne, se puede observar en ha-MYXV un inserto de 2,8 kb (Ins-H1) que interrumpe el gen *M009L*, dividiéndolo en 2 fragmentos más pequeños a ambos lados del inserto. En el fragmento insertado se encuentran genes con cierto grado de homología a *M060R*, *M061R*, *M064R* y *M065R* del MYXV clásico, llamados *M157*, *M158*, *M159* y *M160*, respectivamente (ver Figura 3). Además, posee otras 110 mutaciones a lo largo de su genoma, dos de las cuales provocan el truncamiento de la proteína codificada. La mutación del gen *M152R* provoca un truncamiento de la proteína que codifica de 266 aminoácidos a tan solo 60, mientras que la mutación del gen *M036L* provoca un truncamiento de 681 a 583 aminoácidos (Dalton et al., 2019). La proteína codificada por el gen *M152R* se trata de una serpina, concretamente la Serp-3, la cual parece influir en la virulencia del virus (Guerin et al., 2001). El gen *M036L* es homólogo al gen *O1L* del vaccinia virus (Cameron et al., 1999), el cual parece promover la virulencia de ese virus (Schweneker et al., 2012).

Entre los genes presentes en el Ins-H1, destaca *M159*, el cual pertenece a la familia génica C7L y codifica para una proteína que regula el tropismo celular. La proteína *M159* parece ser la responsable de la capacidad de replicación del ha-MYXV en células HN-R (células de liebre), permitiendo superar el bloqueo de la replicación y síntesis de productos tardíos en las mismas (Águeda-Pinto et al., 2022).

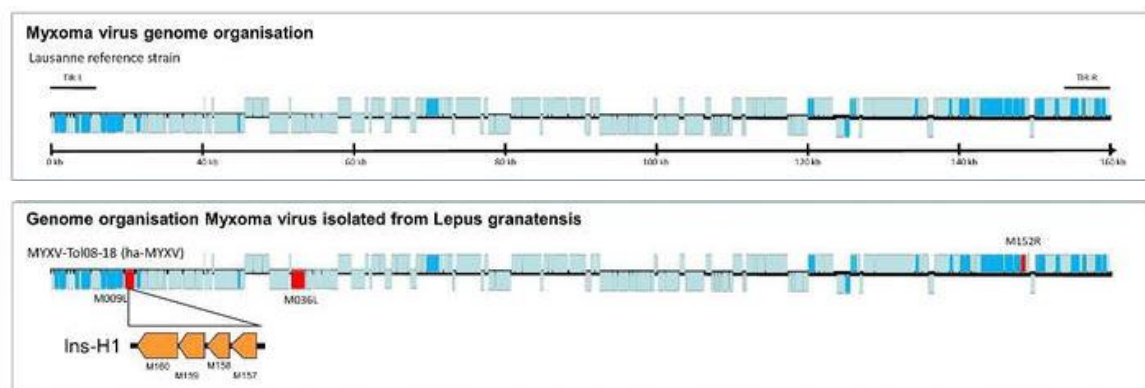


Figura 3. Comparación de los genomas de la cepa de referencia Lausanne y del ha-MYXV. Bajo la línea negra se encuentran los genes L, y por encima los genes R. En azul oscuro se muestran genes con función inmunomoduladora. En rojo se muestran genes interrumpidos. Modificado de (Dalton et al., 2021).

El ha-MYXV supone un peligro para la población de conejos europeos y las liebres ibéricas. En el caso del conejo europeo silvestre, esta especie ya se encuentra amenazada, estando catalogada como “en peligro” por la UICN desde 2019, por lo que la susceptibilidad al ha-MYXV puede suponer un factor que agrave esta situación. También resulta un problema económico y

alimentario debido a la muerte de conejos en granjas. Por otro lado, aunque la liebre ibérica está catalogada como “preocupación menor” por la UICN, la aparición del ha-MYXV, junto con otras enfermedades infecciosas y la pérdida de su hábitat natural, está provocando una alarmante reducción de algunas poblaciones locales. Aunque se ha visto que algunas de las vacunas comerciales proporcionan protección frente al ha-MYXV en conejos, no existe hoy en día ninguna vacuna eficaz en liebres (Santos et al., 2022).

1.4 Planteamiento experimental

El MYXV replica en cultivo celular (Smallwood et al., 2010), lo que hace posible emplear células de conejo y de liebre como modelos para estudiar el tropismo celular del virus. Gracias a esto, se pueden estudiar los cambios en el tropismo celular en cultivos celulares en vez de animales, lo cual tiene numerosas ventajas. Por un lado, es un procedimiento más ético, ya que evita el sufrimiento y muerte de los animales de experimentación. Por otro lado, resulta mucho menos costoso, más rápido y requiere personal menos especializado (Doke & Dhawale, 2015).

En este trabajo se han seleccionado 5 cepas vacunales o atenuadas de MYXV clásico (SG33, VMI30, León162, 4604 y 6918) y un virus del género de los *Leporipoxvirus*, el virus del fibroma de Shope (VFS), que fueron comparados con la cepa de referencia Lausanne y se analizó su capacidad de replicación *in vitro* en células de conejo y liebre.

De las cepas virales seleccionadas, SG33, VMI30 y León162 son cepas de MYXV atenuadas que se emplean como vacuna viva homóloga para la mixomatosis en conejos. El VFS, aunque no se trata de un MYXV, funciona también como vacuna para conejos jóvenes, en este caso heteróloga, generando inmunidad frente a la mixomatosis en conejos (Picoux, 1991). Las cepas 4604 y 6918 son cepas atenuadas naturalmente que fueron aisladas entre 1992 y 1995, en Lleida y Girona respectivamente (Bárcena et al., 2000). Es necesario destacar que las vacunas frente a la mixomatosis tienen que ser vacunas vivas, ya que es necesario su replicación activa para generar una inmunidad celular robusta. Hasta la actualidad, tanto vacunas inactivadas como subunitarias han fracasado a la hora de generar inmunidad en conejos (Picoux, 1991; Revisión por Spiesschaert et al., 2011).

Las cepas atenuadas de MYXV utilizadas en este trabajo presentan mutaciones comunes con el genoma de ha-MYXV. Concretamente, este trabajo se centra en las mutaciones que no forman parte del Ins-H1 del ha-MYXV y que podrían conferir alguna ventaja a la hora de infectar células de liebre. La posibilidad de que estas mutaciones permitiesen una replicación limitada

en células de liebre podría haber facilitado una recombinación de un virus de MYXV con un virus de liebre, desembocando en el salto de especie.

Las cepas León162, 6918 y VMI30 presentan deleciones en el gen *M009L* (JL. Guerin et al., 1998; Morales et al., 2009, comunicación personal KP Dalton). Por tanto, estas cepas tienen una interrupción del gen *M009L* al igual que el ha-MYXV. En el caso de la cepa 4604, esta tiene una mutación que interrumpe el gen *M036L*. Por otro lado, la cepa SG33 tiene una deleción en la R-TIR y parte de la región central del genoma, la cual incluye el gen *M152R* (Cavadini et al., 2010).

En el caso de VFS, se selecciona para este trabajo debido a su ya conocido uso como vacuna heteróloga en conejos. Aunque no se trata de un MYXV, es interesante comprobar si puede replicar en células de liebre y, en tal caso, podría ser un candidato para comprobar si su inoculación en liebres podría generar inmunidad frente al ha-MYXV, al igual que hace contra el MYXV.

1.5 Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es la caracterización de 5 cepas vacunales o atenuadas de MYXV (SG33, VMI30, León162, 4604 y 6918) y del VFS respecto a su capacidad de infección y replicación en células de liebre. Para ello se pretende comparar el número de genomas virales y partículas infecciosas presentes tras infectar células de liebre respecto a las detectadas al infectar células de conejo. También se quiere comprobar la expresión de genes tempranos y tardíos, ya que proporcionan información sobre el ciclo replicativo de los virus.

2. METODOLOGÍA

2.1 Líneas celulares RK13 y HN-R y su mantenimiento

Se emplearon dos líneas celulares distintas: la línea RK13 (CCL-37™, ATCC, curadas del virus de la diarrea bovina viral), de *Oryctolagus cuniculus* (conejo europeo), y la línea HN-R (CCLV-RIE 1001, *Friedrich-Loeffler-Institut*, Greifswald, Alemania), de *Lepus europaeus* (liebre europea). Las dos líneas celulares consisten en células epiteliales procedentes de tejido de riñón, lo que facilita la comparación de los resultados en cada una. También se sabe que la línea RK13 es susceptible a MYXV, lo cual la hace adecuada para los objetivos de este trabajo.

Para mantener las células empleadas en este trabajo se hicieron subcultivos (pases) periódicos 2 veces a la semana para RK13 y una vez a la semana para HN-R. En estos pases

primero se retira el medio antiguo del frasco de 75 cm² (Falcon™, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), se lava con *Dulbecco's phosphate-buffered saline*, DPBS (Gibco™, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), dos veces y se añade Tripsina-EDTA al 0,15% (Gibco™, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para despegar las células de la superficie del frasco. Una vez que las células ya se han despegado, se neutraliza la tripsina empleando medio completo y se pasan las células a un nuevo frasco con medio fresco. Las células RK13 se diluyen en cada subcultivo entre 8 y 10 veces, mientras que las células HN-R se diluyen entre 2 y 3 veces.

El medio empleado en el mantenimiento de las células RK13 fue *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM (Gibco™, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Este medio estaba suplementado con Suero Fetal Bovino, SFB, (Sigma-Aldrich™, Burlington, Massachusetts, USA) al 10% volumen/volumen (v/v) y antibiótico-antimicótico (Gibco™, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a una concentración de 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0,25 µg/mL de anfotericina B.

El medio de la línea celular HN-R consiste en una mezcla a volúmenes iguales del medio *Ham's F12* y *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), ambos de Gibco™. Este medio estaba suplementado de manera análoga al medio de RK13, con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico.

Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera saturada de agua y con 5% de CO₂ en todos los casos. Además, fueron observadas cada día con microscopio invertido ECLIPSE Ts2 (Nikon™; Minato, Tokio, Japón) para comprobar su estado, observar la confluencia y corroborar ausencia de contaminaciones.

2.2 Titulación de virus

Se llevaron a cabo las titulaciones de los stocks de las cepas virales, así como los lisados celulares de RK13 y HN-R tras su infección. Estos stocks fueron generados mediante la infección de células RK13 con cada cepa viral, a excepción de la cepa Lausanne, y el lisado de las células mediante 3 ciclos de congelación a -80°C y descongelación a temperatura ambiente. La cepa Lausanne estaba previamente cuantificada, y está modificada de modo que permite la producción de EmGFP (*Emerald Green Fluorescent Protein*) en células infectadas, lo que permite su detección en cultivo empleando un filtro de 470 nm. Esta proteína emite a una longitud de onda de 510 nm.

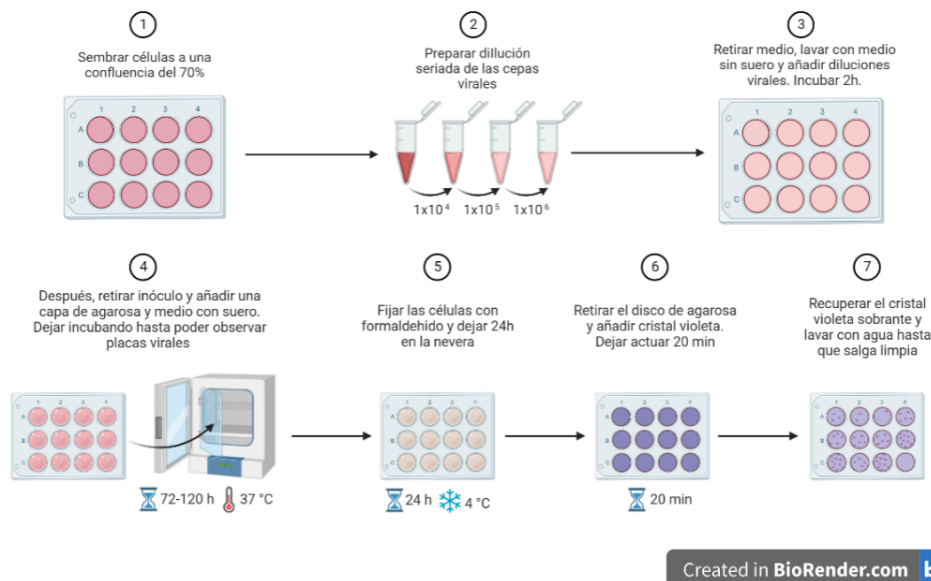


Figura 4. Esquema del procedimiento de una titulación viral. Creado en BioRender.com

El procedimiento de las titulaciones virales se puede observar en la Figura 4. Primero, se sembró en cada pocillo de una placa de 12 pocillos (Falcon™, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) células RK13 a una confluencia de aproximadamente el 70%. Para ello, tras levantar las células del frasco, se contaron con una cámara de Neubauer y se sembraron 50 000 células en cada pocillo, de manera que pasadas 24h la confluencia era la adecuada. A continuación, se prepararon diluciones seriadas de cada cepa viral a titular (diluciones desde 10^{-1} a 10^{-6}) y se añadieron a los pocillos, los cuales habían sido previamente lavados con DMEM sin suero.

Tras dejar incubar 2h con el virus a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el inóculo y se añadió *Minimum Essential Medium* (MEM) mezclado con agarosa al 1% peso/volumen (p/v). Al enfriar, el medio se gelifica sobre la capa de células, impidiendo que los virus puedan extenderse por todo el pocillo libremente y permitiendo que luego se puedan contar placas virales. También se añadió DMEM con SFB al 10%, para que las células puedan crecer y formar placas virales. Las placas virales en estas titulación consisten en un amontonamiento de células causado por el virus.

Las células se dejaron incubando en las condiciones antes descritas entre 3 y 5 días, cuando ya se podían observar a microscopio placas virales de un tamaño suficiente. Después, se fijaron las células añadiendo formol tamponado (10% v/v, tamponado en PBS), dejándolo actuar a 4°C durante un día. Pasado ese tiempo, se retiraron los discos de agar y se tiñeron las células fijadas con cristal violeta (5 mg/mL, disuelto en una mezcla 1:4 de Metanol y H₂O destilada)

durante 20 min. Finalmente, se aclararon los pocillos con agua corriente y se contaron las placas virales. Asumiendo que cada placa viral corresponde a la infección por único virus, sabiendo la dilución en la que se han contado y cuanto volumen de dilución viral se ha inoculado, se puede determinar la cantidad de unidades formadora de placa (ufp) por mL.

2.3 Replicación *in vitro* de virus en RK13 y HN-R

Se infectaron células RK13 y células HN-R (en pocillos individuales) con las 7 cepas virales a una MOI de 0,1 (0,1 ufp por cada célula sembrada). Las células control de RK13 y HN-R a tiempo cero fueron congeladas inmediatamente después de añadir el inóculo (0h post infección), mientras que otras réplicas de las células fueron congeladas después de pasar 4 días incubando a 37°C y 5% de CO₂ en presencia del virus adecuado (96h post infección). Se lisaron las células como se describió en el apartado 2.2. Como control se emplearon células en las cuales no se inoculó ningún virus. Todo este proceso se realizó en duplicado.

Los lisados celulares son las muestras analizadas en los siguientes experimentos. Primero fueron tituladas usando el procedimiento previamente descrito, para comprobar si había habido un incremento o descenso en el número de partículas infecciosas entre 0 y 96h. Además, se hicieron fotografías de las células infectadas con el microscopio invertido para analizar el efecto citopático producido por cada cepa viral.

2.4 Cuantificación de genomas virales mediante qPCR

Para poder cuantificar el número de genomas virales presentes en las muestras, primero se llevó a cabo la extracción del ADN de todas las muestras. Para ello se utilizó el *QIAamp® DNA Mini kit* (QIAGEN®, Venlo, Países Bajos) y este ADN fue usado como molde de la qPCR, que consiste en una PCR cuantitativa. Las condiciones escogidas para la amplificación son las descritas en (Abade Dos Santos et al., 2021). La mezcla de reacción empleada contenía la *PrimeTime gene expresión Master Mix 2x* (IDT®, Coralville, IA, Estados Unidos), un par de cebadores y una sonda dirigidos al gen *M000.5L/R* y *18S rDNA* (recogidos en Tabla 2). El gen *M000.5L/R* nos da información sobre el número de genomas virales, al ser un gen presente en todas las cepas vacunales de MYXV, mientras que el gen *18S rDNA* nos indica la presencia de los genomas de las células de conejo y liebre, sirviendo como controles internos e indicando que la extracción de ADN se ha llevado a cabo correctamente.

Tabla 2. Genes diana y secuencias de los cebadores empleados en la qPCR y RT-PCR. También se incluyen las sondas y fluoróforos empleados en la qPCR.

GEN DIANA	CEBADOR DIRECTO 5'-3'	CEBADOR REVERSO 5'-3'	[FLUORÓFORO] SONDA TAQMAN	TAMAÑO AMPLICIÓN
M000.5L/R	CGACGTAGATTATC GTATACC	GTCTGTCTATGTATTC TATCTCC	[FAM] CGGTCTATCCTCGGGCAG ACATAG	125 pb
M007L/R	CACTTCGCCACCATGA ACG	GTCCAAGAAACTTAC CAGG	-	956 pb
M008.1L/R	GCCTTCCGCGACGATT TCG	GTGTAATAATACCGC GTATCC	-	1321 pb
18S rDNA	TATGGTTCCTTTGGTC GCTCGCTC	TCTGATAAATGCACG CATCCCCC	[CY5] AGCTAATACATGCCGACG GGCGTGACC	116 pb

En los pocillos de una placa de 96 pocillos MicroAmp® (Applied Biosystems®, California, Estados Unidos), se añadió la mezcla antes descrita junto con el ADN extraído de las muestras. Además, se hicieron dos rectas de calibrado utilizando cantidades conocidas de un producto de PCR de M000.5L/R y 18S rDNA. Para calcular el número de copias de genomas virales presentes en las muestras, se determinaron los ciclos umbrales de las gráficas de amplificación obtenidas en la qPCR. Para ello se seleccionaron manualmente los umbrales y se utilizó el ciclo en el que el umbral cortaba con la curva de amplificación como ciclo umbral o C_T (ver Figura 5 como ejemplo).

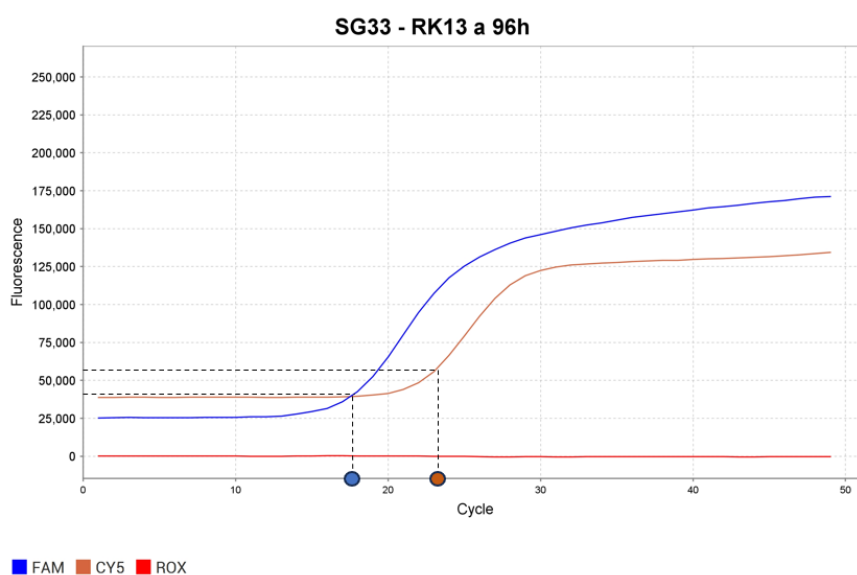


Figura 5. Gráfica ejemplo de amplificación de los genes M000.5 (fluoróforo FAM) y 18S rDNA (fluoróforo CY5) en la qPCR. ROX es el tinte fluorescente de referencia pasiva. Se representan los C_T como los puntos azul y naranja.

Se usaron controles negativos de la extracción de ADN (componentes del kit sin ADN) y de la qPCR (mezcla antes descrita sin molde de ADN), mientras que se usó el virus Gran05/09-1 (Dalton et al., 2015) como control positivo. El termociclador donde se llevó a cabo la reacción y medición de señales fue *QuantStudio 5* (Applied Biosystems®, California, Estados Unidos).

2.5 Análisis de expresión génica mediante RT-PCR y qPCR

Para poder analizar la expresión de genes tempranos (*M007L/R*) y tardíos (*M008.1L/R* y *M000.5L/R*) primero se extrajo el ARN presente en las muestras utilizando *GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich™, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos). Con este ARN como molde se llevó a cabo una RT-PCR en dos pasos. El primer paso fue la retrotranscripción de todo el ARN de las muestras a ADN copia (ADNc) siguiendo las instrucciones de la Transcriptasa inversa *SuperScript™ III* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y empleando como cebadores hexámeros aleatorios (estos cebadores permiten la retrotranscripción de todos los tipos de ARN).

A continuación, se llevó a cabo una PCR utilizando la polimerasa *GoTaq® Green DNA Polymerase* (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) para amplificar el ADNc de los genes *M008.1L/R* y *M007L/R* (ver cebadores y tamaños de amplicón en Tabla 2). Se hizo una electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% en TAE, usando como tinte *SafeView™ Classic* (abm®, Vancouver, Canadá) al 0,01% (v/v). La electroforesis se llevó a cabo a 90V constantes y el gel resultante fue revelado.

También se llevó a cabo una qPCR, de manera análoga a lo descrito en el apartado 2.4, teniendo como objetivo cuantificar la cantidad de ADNc del gen *M000.5L/R*.

3. RESULTADOS

3.1 Generación de stocks virales

Fue necesario generar stocks de todas las cepas virales, menos Lausanne, para poder llevar a cabo los experimentos planificados. Para ello, se infectaron células RK13 a confluencia del 70% con una MOI aproximada de 0,1 con los virus disponibles (en el caso de VFS menor, ya que el título del virus disponible no era suficiente para alcanzar esa MOI). La cepa Lausanne se obtuvo de un stock de concentración conocida y no hubo que generar más. Pasados tres días se lisaron las células infectadas con las diferentes cepas, generándose stocks virales en la cantidad

necesaria como para realizar los experimentos planificados. Estos nuevos stocks se titularon, dando como resultado los títulos descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Títulos de los stocks virales utilizados.

CEPA VIRAL	SG33	VMI30	LEÓN162	4604	6918	VFS
TÍTULO STOCK (ufp/mL)	$1,89 \cdot 10^6$	$1,55 \cdot 10^5$	$2,00 \cdot 10^5$	$3,11 \cdot 10^4$	$3,33 \cdot 10^4$	$2,09 \cdot 10^2$

Cabe destacar las diferencias observadas en el título obtenido. El mayor título se obtuvo con la cepa SG33, seguida por las cepas VMI30 y León162, aunque con un orden de magnitud de diferencia. Estas cepas se tratan de cepas vacunales homólogas. Las cepas atenuadas (4604 y 6918) presentaron 10 veces menos título que las cepas vacunales VMI30 y León162. El título del stock de VFS, la cepa vacunal heteróloga, era bajo en comparación con el resto, pero también se infectó con menos cantidad a la hora de generar los stocks, debido a que el virus disponible tenía un título bajo.

3.2 Efecto citopático causado por los virus en células RK13 y HN-R

Para analizar el efecto citopático que las cepas virales aquí estudiadas provocan, se tomaron fotografías de las células RK13 y HN-R durante las titulaciones de los virus y 96h después de infectarlas con una MOI de 0,1.

La infección de las células RK13 provocó la aparición de efecto citopático en las mismas, el cual fue distinto en función de la cepa. En la Figura 6.A se muestra el aspecto de una monocapa de células RK13 (conejo) control. En la imagen 6.B se muestra el aspecto de una placa viral causada por la cepa Lausanne, durante el proceso de titulación viral, que se caracteriza por la acumulación de células de morfología más redondeada sobre la monocapa debido a un excesivo crecimiento de las células. Además, se pudo corroborar, al observar la fluorescencia de la GFP producida en las células, ver imagen 6.C, que las células infectadas eran las mismas que las presentes en el amontonamiento. Acúmulos de células similares a los provocados por Lausanne también se observan en las células de conejo infectadas por 6918, 4604, SG33 y León162 (Imágenes E-H en la Figura 6). Las placas virales provocadas por VMI30 (imagen D en la Figura 6), en cambio, son muy distintas ya que adoptan la forma de sincitios. Estos sincitios son fruto de la fusión de células vecinas, generando un único citoplasma con numerosos núcleos. El VFS también provoca acumulaciones celulares, aunque estas tienen una morfología ligeramente

distinta a las provocadas por cepas de MYXV, principalmente porque su tamaño es mucho menor (ver imagen I en la Figura 6).

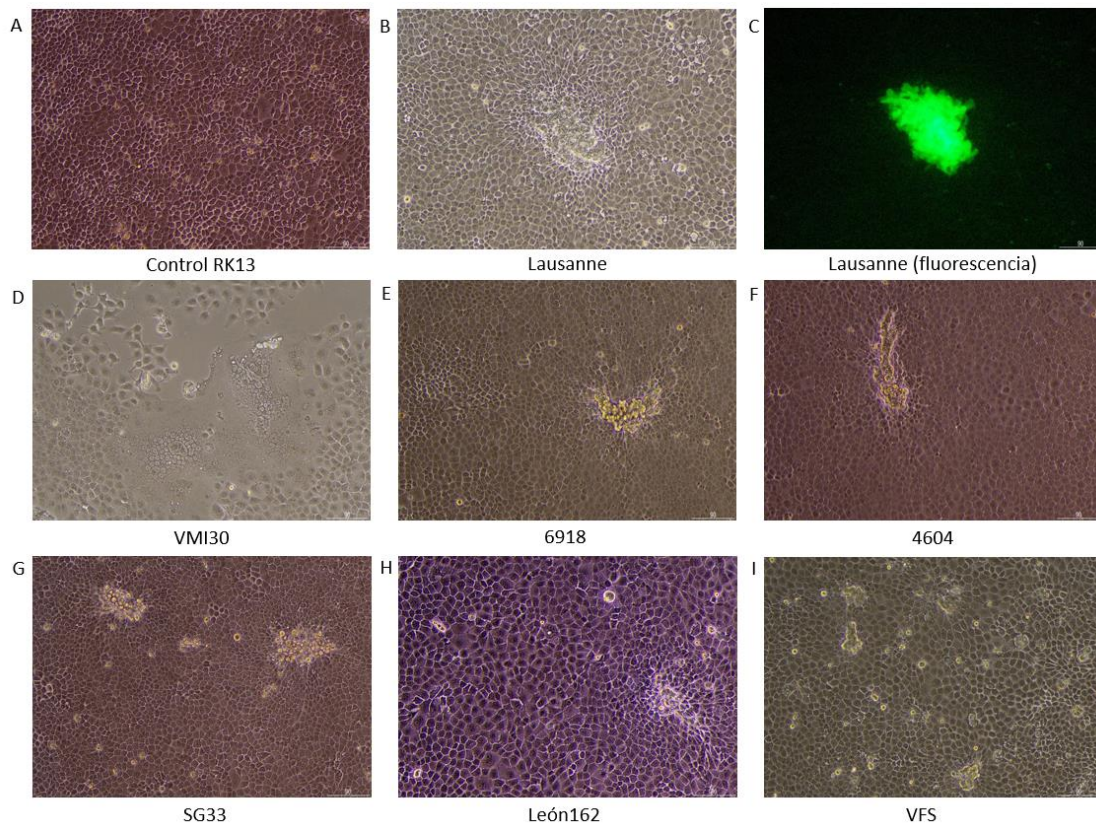


Figura 6. Placas virales de distintas cepas virales en RK-13 (conejo) durante titulaciones virales. A) Aspecto de células control B) Acumulación de células causada por la infección con Lausanne. C) Fotografía tomada mediante fluorescencia de la imagen B. D) Sincitio provocado por VMI30. E-H) Acúmulos celulares causados por las cepas 6918, 4604, SG33 y León162. I) Pequeños acúmulos celulares causados por VFS.

En la Figura 7 se presenta el efecto citopático en células RK13 (conejo) 96h después de ser infectadas a una MOI de 0,1. Hay que tener en cuenta que en este caso no se añadió una capa de agar, como en las titulaciones, y por tanto no se evita la dispersión del virus. La cepa Lausanne generó acumulaciones de mucho mayor tamaño que las vistas en las titulaciones. El VFS también generó un efecto citopático mayor al visto anteriormente, pero en ambos casos la monocapa de células mantiene su integridad.

En cambio, el resto de virus provocaron la destrucción de la integridad de la monocapa. Se puede observar en la Figura 7 (imagen D) como los sincitios típicos de VMI30 ocupan toda la superficie y se encuentran despegados y fragmentados. En la imagen F se pueden ver numerosos agujeros en la monocapa, debidos a la muerte de células, pero además en algunas zonas se empiezan a fusionar células vecinas y formar pequeños sincitios. En las imágenes E, G y H solo

quedan restos celulares, de modo que los virus 6918, SG33 y León162 provocaron la completa destrucción de la monocapa de células.

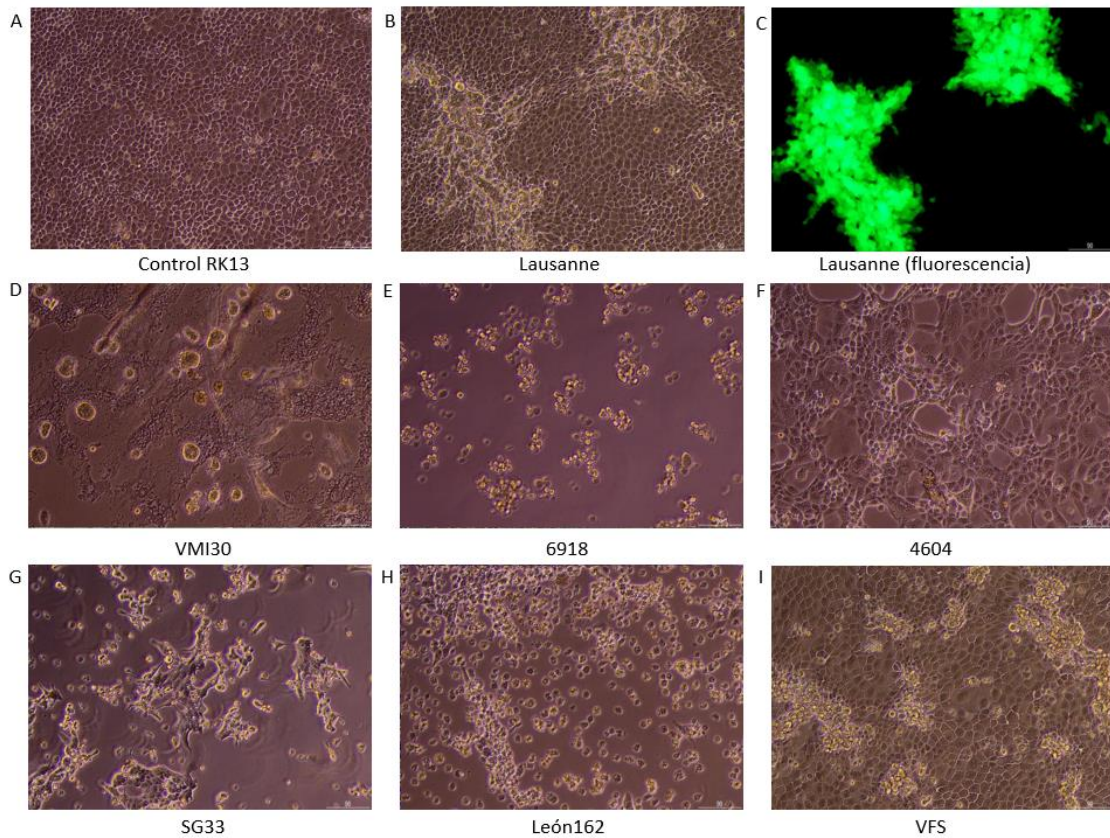


Figura 7. Efecto citopático de distintas cepas de MYXV en RK-13 (conejo) 96h post infección a una MOI de 0,1. A) Aspecto de células control. B) Acumulaciones provocadas por Lausanne. C) Imagen en fluorescencia de la imagen B. D) Syncitios destruidos de VMI30. E) Restos celulares tras la infección con 6918. F) Monocapa infectada por 4604, empezando a despegarse. G) Restos celulares tras la infección por SG33. H) Restos celulares tras la infección con León162. I) Acúmulos celulares causados por VFS, de mucho más tamaño que los vistos en las titulaciones.

En las células HN-R (liebre) no se observó efecto citopático en la mayoría de las muestras pasadas 96h y a una MOI de 0,1, teniendo un aspecto idéntico a las células control. Tan solo se observaron acumulaciones en células infectadas por 4604 y 6918 (señaladas en la Figura 8), pero eran extremadamente escasas y de tamaño mucho menor a las observadas en RK13.

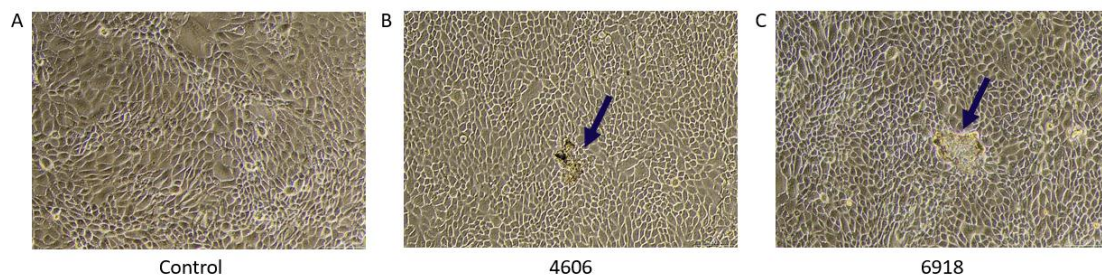


Figura 8. Efecto citopático causado por las cepas 4604 y 6918 de MYXV en células HN-R (liebre). A) Células control B) Células infectadas por 4604 tras 96h C) Células infectadas por 6918 tras 96h

Por tanto, se concluye que las células RK13 infectadas mostraron en todos los casos efecto citopático abundante, mientras que las células HN-R aparentemente presentaban un efecto citopático en tan solo dos muestras, las células infectadas con 4606 y 6918. Además, la morfología de estos era distinta, con cúmulos mucho menores y prominentes. A continuación, se llevaron a cabo las titulaciones virales y la cuantificación de los genomas virales, para comprobar si estos resultados son consistentes o no con el efecto citopático observado.

3.3 Comparación de títulos virales 96h post infección

Una vez observado el efecto citopático, las células se lisaron y se titularon las suspensiones resultantes. Esta titulación permite determinar la cantidad de partículas infecciosas, que no equivale necesariamente el número total de viriones, presentes en las células. Los resultados de la titulación viral se presentan en la Figura 9 y el ratio de aumento en la Tabla 4. El número de partículas infecciosas aumenta considerablemente en todas las cepas seleccionadas en RK13 después de 96h, siendo la cepa donde se observa el mayor aumento SG33 (3067 veces más) y la de menor aumento 6918 (12 veces más). En el caso de la infección de las células HN-R, se observa un descenso en el título en todas las cepas después de 96h (aunque solo en León162, 6918 y VFS $p < 0,05$). En las cepas Lausanne y VFS no se detectaron partículas infecciosas pasadas las 96h, mientras que, en el resto de las cepas, aun habiendo un descenso del título, se pueden detectar partículas infecciosas pasado ese tiempo. El descenso más grande en las células HN-R, excluyendo Lausanne y VFS donde desaparecieron todas las partículas infecciosas, se observa en SG33, quedando tan solo un 5% de las partículas infecciosas originales.

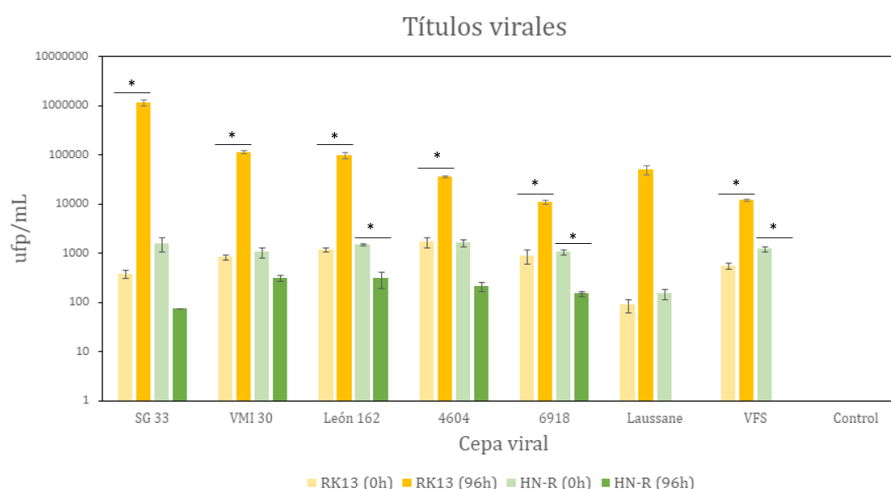


Figura 9. Titulación viral de células RK13 y HN-R tras añadir distintas cepas virales. En amarillo se muestran los títulos virales en RK13 a 0 y 96h y en verde se muestran los títulos en HN-R a 0 y 96h. El asterisco (*) indica $p < 0,05$. Se empleó una distribución t de Student de dos colas y se supuso homocedasticidad en este análisis.

Otra observación interesante es que a tiempo 0h las células HN-R y RK13 recibieron una cantidad muy similar de ufp de una misma cepa, excepto SG33 donde hay menos título a tiempo 0h en las células HN-R que en RK13. Comparando cepas distintas, este inóculo inicial varía entre 100 y 1000 ufp.

Los resultados de las titulaciones también parecen corroborar los resultados del efecto citopático: en las células RK13 el título es mucho mayor que en HN-R, y, en consecuencia, el efecto citopático también es mayor. Además, parece que las cepas vacunales (SG33, VMI30 y León162) alcanzaron mayor título que las cepas atenuadas (4604 y 6918) en RK13. Sin embargo, tan solo se observó efecto citopático en HN-R en células infectadas por 4604 y 6918, a pesar de que también había partículas infecciosas en las células infectadas por SG33, VMI30 y León162. Esto puede implicar que el efecto observado se trate de un artefacto del cultivo. A continuación, se llevó a cabo la PCR cuantitativa para observar si el cambio en el número de genomas virales concuerda con el cambio en partículas infecciosas.

3.4 Cuantificación de genomas virales presentes en las células RK13 y HN-R 96 h post infección mediante qPCR

Mediante una qPCR, se obtuvo el número de genomas de MYXV presente en cada muestra, dato a comparar con la cantidad de partículas infecciosas. En la Figura 11 se puede observar los resultados de esta cuantificación.

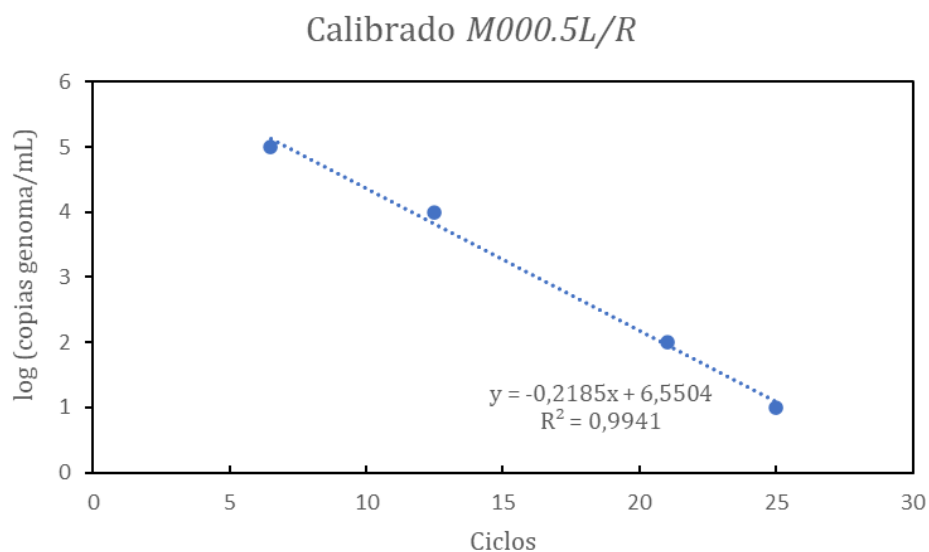


Figura 10. Recta de calibrado del gen *M000.5L/R*.

Se usaron los C_T , determinados como se describió en material y método, de unos stocks de productos de PCR del gen *M000.5L/R*, con número de copias conocido. Con esos datos se hizo una recta de calibrado, mostrando un coeficiente R^2 de 0,99 (ver Figura 10), que se empleó para sustituir las C_T de las muestras y obtener así el número de genomas. No se presenta el calibrado ni resultados de *18s rDNA*, porque se observó contaminación en su control negativo. No se analizó el número de genomas en VFS, ya que el gen diana no está presente en este virus.

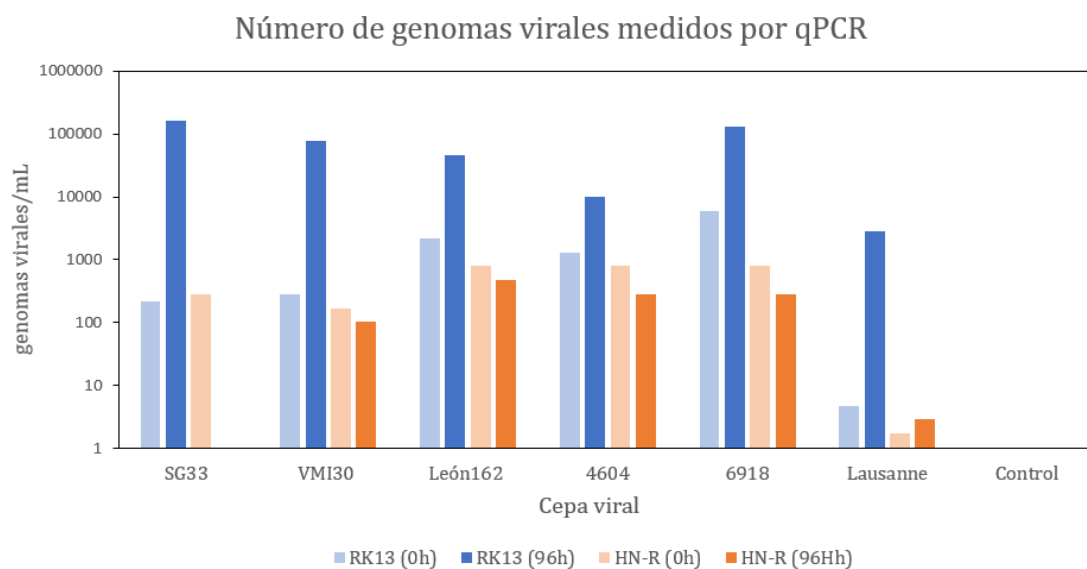


Figura 11. Genomas virales presentes en las muestras. En azul se muestran los genomas virales en RK13, y en naranja en HN-R

En la Figura 11 se presentan los resultados, pudiéndose observar un aumento en el número de genomas en todas las cepas entre 0 y 96h en RK13. En cuanto a HNR, hay un pequeño descenso en la cantidad de genomas en todas las muestras y en SG33 desaparecen por completo. Una particularidad, es que parece haber un pequeño aumento en la cantidad de genomas virales de Lausanne en HN-R, pero no se detectaron partículas infecciosas en esas muestras.

En la Tabla 4 se muestra el aumento de genomas virales, y se compara este dato con el aumento de partículas infecciosas. En términos generales, el aumento observado en partículas infecciosas va acompañado de un aumento de genomas virales y los descensos en partículas infecciosas también acompañan a un descenso de genomas. Estos cambios no son idénticos entre titulaciones y la qPCR, pero la cepa SG33 sigue siendo la que tiene un mayor aumento. Sin embargo, el mayor descenso en el número de genomas virales no se da en 6918 (donde se dio el mayor descenso de título), sino en 4604. Otra diferencia es que el número de genomas virales

de SG33 en HN-R baja a 0, lo cual resulta contradictorio, ya que se detectaron partículas infecciosas en esa muestra. Sin embargo, ya se había observado en los títulos un descenso del 95% en la cantidad de partículas virales, por lo que es posible que no se pudiesen detectar genomas virales.

Tabla 4. Cambio en la cantidad de partículas infecciosas y genomas virales de cada cepa viral, expresado como el ratio de la cantidad a 96h y 0h.

CEPA VIRAL	SG33	VMI30	LEÓN162	4604	6918	LAUSANNE	VFS
RK13 TÍTULO 96h/0h	3066,67	136,36	83,87	20,90	12,43	571,43	21,82
HN-R TÍTULO 96h/0h	0,0488	0,30	0,20	0,13	0,14	0	0
RK13 GENOMAS VIRALES 96h/0h	757,70	273,21	21,33	7,69	21,33	587,15	-
HN-R GENOMAS VIRALES 96h/0h	0	0,60	0,60	0,36	0,36	1,67	-

Una vez analizados estos datos, se podía concluir que había habido replicación de todas las cepas virales en RK13 (conejo), pero no quedaba claro si había habido replicación en HN-R (liebre). Si no hubiese habido replicación, sería esperable que pasadas 96h los viriones infecciosos hubiesen desaparecido por completo, como ocurre en Lausanne y VFS. Sin embargo, la presencia de algunas partículas infecciosas en las cepas SG33, VMI30, León162, 4604 y 6918 podría deberse a una replicación muy mermada. Para comprobar si esto era así, se llevó a cabo un análisis de la expresión génica, ya que una evidencia de replicación es la expresión de genes relacionados con su ciclo replicativo.

3.5 Expresión génica analizada mediante RT-PCR y qPCR

Para determinar si había habido expresión génica, se aisló el ARN de las células HN-R infectadas con SG33, VMI30, León162, 4604 y 6918 y se retrotranscribió a ADNc. La presencia de ADNc de genes tardíos demostraría que el ciclo replicativo estaba teniendo lugar, mientras que el ADNc de genes tempranos indicaría que el virus entró a la célula, pero no informa sobre si continuó su ciclo replicativo. Los resultados en la expresión de los genes tempranos y tardíos se resumen en la electroforesis mostrada en la Figura 12. No se observaron bandas de los

productos de PCR del ADNc, a excepción del control positivo del gen *M007L/R*, donde se observa una banda de alrededor de 1kb, el tamaño esperado del amplicón de este gen. Este control positivo se trataba de la muestra de SG33 en RK13 a las 96h. Esta muestra fue seleccionada como control positivo ya que al haber sido el virus que más se replicó, se tuvieron que haber expresado sus genes tempranos y tardíos. Sin embargo, no se observó el gen *M008.1L/R* del control positivo, y en su carril se observa una banda a menos de 75 pb.

En cuanto a la qPCR realizada sobre el ADNc y dirigida al gen tardío *M000.5L/R*, la curva de calibrado (no mostrada) realizada tenía la siguiente ecuación: $y = -0,1874x + 6,9731$, siendo “y” el logaritmo del número de copias, con R^2 de 0,99. Una vez sustituidos los datos, el resultado es de 7289 copias de ADNc/mL. Por tanto, se puede concluir que tanto los genes tempranos como tardíos se expresaron en este control positivo, es decir, en el virus SG33 96h después de infectar células de conejo. En el resto de las muestras no se consiguió amplificar tampoco este gen.



Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR del ADNc. Las muestras que comienzan con 3 indican que se trata de células HN-R a 0h, y las que comienzan con 8 son células HN-R a 96h post infección. El segundo dígito indica la cepa viral: 1-SG33, 2-VMI30, 3-León162, 4-4604 y 5-6918. M7 indica que se usaron los cebadores para el gen *M007*, mientras que M8 indica que se usaron los cebadores para el gen *M008.1*. El control positivo es C+ y el control negativo de la PCR es C-. No se muestran las muestras con el gen diana *M008.1L/R*, ya que no se obtuvo ninguna banda.

Estos resultados parecen indicar que, efectivamente, tanto un gen temprano (*M007L/R*) como un gen tardío (*M000.5L/R*) se expresaron en el virus SG33 en RK13. Este resultado es acorde al hecho de que ese virus fue el que mayor replicación tuvo. Sin embargo, la poca intensidad de la banda del gen temprano y nula presencia del gen tardío *M008.1L/R*, junto a las pocas copias del gen tardío *M000.5L/R*, dan a entender que o bien esta expresión fue muy reducida o el procedimiento no estaba optimizado para poder detectarlo.

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo consistía en comprobar la capacidad de replicación *in vitro* de varias cepas virales de MYXV y VFS en células de conejo y liebre, así como caracterizarlas. Estas cepas podían resultar candidatas para vacunas para la mixomatosis en liebre. Respecto a la caracterización, resulta interesante observar el efecto citopático generado por los virus. En la mayoría de las cepas de MYXV (SG33, León162, 6918), el efecto citopático es parecido a la cepa de referencia Lausanne: acumulaciones de células redondeadas sobre una monocapa. Sin embargo, destaca la cepa VMI30, que es capaz de generar sincitios (fusión de células que provocan un citoplasma multinucleado), comportamiento ya descrito en otras cepas de MYXV como la cepa italiana BTK/RB/84 (Picoux, 1991). Curiosamente, al infectar células de conejo con la cepa 4604, parece que se empezaban a formar pequeños sincitios, mucho menos claros que en la cepa VMI30. El efecto citopático detectado en las células HN-R por las cepas 4604 y 6918 consistía en pequeños acúmulos refringentes, aunque su ausencia en células donde se pudieron detectar partículas infecciosas hace dudar sobre si se debe a un artefacto del cultivo celular. Una manera de comprobarlo en futuros experimentos sería tratar de detectar proteínas virales en las células directamente, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia.

Todas las cepas virales testadas de MYXV (SG33, VMI30, León162, 4604, 6918 y Lausanne) y VFS fueron capaces de replicarse, en mayor o menor medida, en células de conejo. Los resultados de la qPCR también demostraron un aumento en el número de genomas virales en esas células. Estos resultados son los esperados, puesto que las cepas seleccionadas son vacunas comerciales en conejos (SG33, VMI30, León162 y VFS) o son cepas de MYXV atenuadas aisladas de conejos salvajes (4604 y 6918). Además, se sabe que tanto el MYXV como el VFS son capaces de replicar células RK13 (Jeřábek & Dedek, 1981; Smallwood et al., 2010). Una particularidad es que las cepas vacunales SG33, VMI30 y León162 mostraron mayor capacidad de replicación que las cepas atenuadas y el VFS (que es una vacuna heteróloga). Esto podría quizás explicarse por estar más habituadas a su crecimiento en cultivo celular que las cepas atenuadas, que fueron aisladas de animales salvajes y no han tenido muchos pases en células en cultivo.

En cuanto a las células de liebre, sería esperable que el MYXV y el VFS no sean capaces de replicarse en ellas, al tratarse de virus que infectan solo conejos. De acuerdo con esto, la cepa Lausanne y VFS mostraron una ausencia total de partículas virales infecciosas 96h después de infectar células de liebre. Aunque se detectó un ligero aumento de copias de genomas de la cepa

Lausanne por qPCR, el número de copias es inferior a 10 y por tanto no parece relevante. El resto de las cepas presentaron un descenso en su título viral, pero no una desaparición total. Esto puede indicar que los virus se replicaron, aunque a una tasa tan baja que no consiguieron aumentar el título viral respecto al inóculo. También podría indicar, en cambio, que parte de los viriones inoculados consiguieron resistir durante 96h, pero no replicaron. Sin embargo, el MYXV se trata de un virus muy sensible a la temperatura, reduciéndose el título viral rápidamente incluso a temperatura ambiente (comunicación personal KP Dalton), por lo que resulta poco probable que los viriones fuesen capaces de sobrevivir tantas horas a los 37°C de incubación.

La posibilidad de que las cepas de MYXV replicasen deficientemente en liebre parece la situación más probable. Además, las cepas seleccionadas (SG33, VMI30, León162, 4604 y 6918) tienen mutaciones comunes con el ha-MYXV, lo que quizás podría ayudar a explicar una mayor capacidad de replicación en células de liebre.

Las cepas vacunales VMI30 y León162, y la cepa atenuada 6918 tienen delecionado el gen *M009L*, que se encuentra interrumpido en el ha-MYXV. Este gen codifica una proteína de la familia de las proteínas Kelch, al igual que los genes *M006L/R*, *M008L/R*, *M014L* y *M140R* (Cameron et al., 1999). Estos genes codifican ubiquitina ligasas E3 de la clase BTB-BACK-kelch (BBK) putativas, estando el dominio BTB presente en muchos otros poxvirus (Stogios et al., 2005; Revisión por Zhang et al., 2009). Se desconoce cuál puede ser la función del producto del gen *M009L*, pero parece que no es crítico para una elevada virulencia ni necesario para la replicación viral en células RK13 (Kerr et al., 2010; McCabe & Spibey, 2005). Curiosamente, en el genoma del VFS existe un gen homólogo al *M009L*, llamado *S009L*, que se encuentra parcialmente duplicado (Willer et al., 1999).

En el caso de la cepa SG33, presenta una deleción que afecta al gen *M152R*, cuyo producto génico es la proteína Serp3, que está truncada en el ha-MYXV. En experimentos previos, la deleción del gen *M152R* no afectó a la capacidad de replicación en células RK13, pero sí que redujo considerablemente la virulencia del virus. De hecho, su deleción provocó que no se generasen lesiones secundarias al inocular el virus en conejo. Además, al analizar esta proteína se vio que había estructuras secundarias típicas de las serpinas (inhibidores de serin proteasas) que estaban delecionadas en Serp3 (Guerin et al., 2001). El papel concreto de Serp3 no ha sido elucidado, más allá de ser un factor de virulencia, mientras que el resto de serpinas presentes en el MYXV (Serp1 y Serp2) se sabe que tienen funciones antiinflamatorias y antiapoptóticas (Macen et al., 1993; Petit et al., 1996).

Las cepas atenuadas 6918 y 4604 tienen el gen *M036L* interrumpido, al igual que el ha-MYXV. Este gen es ortólogo al gen *O1L* del vaccinia virus, otra especie de poxvirus. El gen *O1L* codifica para la proteína O1, la cual potencia la activación de la ruta de las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2) por el factor de crecimiento del vaccinia virus y factor de crecimiento epidermal. Esto se traduce en un incremento de la virulencia del vaccinia virus (Schweneker et al., 2012). Sin embargo, en el MYXV se desconoce cuál es el papel del gen *M036L*. Al contrario que el gen *O1L* del vaccinia virus, en el MYXV el gen *M036L* se encuentra tanto en cepas virulentas como atenuadas, por lo que su función no parece relacionada con la virulencia (Dalton et al., 2010, 2021; Morales et al., 2009).

Por tanto, *M009L*, *M036L* y *M152R* son genes sin una función clara, y tanto *M009L* como *M036L* no parecen tener relación alguna con la virulencia. Esto sumado a que son las principales mutaciones del ha-MYXV, a parte del inserto Ins-H1, significa que quizás podrían tener algún tipo de efecto en el tropismo del virus, de ahí el interés en su estudio.

El análisis la expresión de los genes tempranos y tardíos se hizo con la intención de determinar si ha ocurrido replicación viral, o en caso negativo, determinar en qué punto se ha interrumpido su ciclo o si el virus no ha conseguido entrar en la célula siquiera. Los genes diana, *M007L/R* (un gen temprano) y *M008.1L/R* (un gen tardío) se seleccionaron debido a que se encuentran en doble copia y sus productos génicos son detectables desde las 24 h post infección (Águeda-Pinto et al., 2022). Por tanto, se esperaba que su expresión fuese suficientemente alta como para detectarla. No se pudo detectar ARNm del gen *M008.1L/R*, pero la presencia de una banda de tan solo 75 pb en su control positivo indica que esto podría deberse a la formación de una estructura derivada de la hibridación de los propios cebadores o una amplificación inespecífica, y que por tanto los cebadores no se unieron a su diana. En el caso del ARNm del gen *M007L/R*, se detectó en el virus SG33 96h después de infectar células de conejo. En estas condiciones el virus se replicó, como muestra el aumento de tanto genomas virales como partículas infecciosas. Otro gen tardío presente en doble copia, el gen *M000.5L/R*, pudo ser detectado mediante qPCR del ADNc originado a partir del ARN extraído, aunque en muy pocas copias, lo cual parece confirmar el hecho de que se expresaron tanto los genes tempranos como tardíos en SG33 durante su replicación.

La ausencia de bandas en la electroforesis en las muestras de células de liebre 96h después de ser infectadas, así como el hecho de que no se detectase ADNc de los genes tardíos en la qPCR de dichas muestras, parece significar que no ha habido expresión de los genes tardíos

y que por tanto no ha habido replicación. Sin embargo, tampoco se puede descartar la posibilidad de que la sensibilidad del método sea insuficiente, quizás debido a las pocas copias del ARNm del gen tardío que se detectaron en SG33 tras replicar en células de conejo, en comparación con la cantidad de partículas infecciosas. Esto podría deberse a que la metodología empleada no pudo ser optimizada por falta de tiempo, o que parte del ARNm se degradase antes de realizar la extracción de ARN.

En cualquier caso, una conclusión clara que se puede obtener de estos datos es que todas las cepas vacunales y atenuadas de MYXV, y el VFS, son capaces de replicar en células RK13 (de conejo), pero no han replicado en células HN-R (de liebre). Esto descarta su uso como posibles vacunas en liebre para la mixomatosis. También parece que los genes *M009L*, *M036L* y *M152R* no parecen dar una ventaja replicativa perceptible a estos virus a la hora de replicar en células de liebre.

Debido a las limitaciones en tiempo de este trabajo, hay otros aspectos en los que no se ha ahondado y que requieren una mayor investigación. Sería interesante poder repetir los experimentos descritos en apartados anteriores aumentando el número de condiciones distintas. Por ejemplo, se podrían infectar las células con una MOI elevada, para así observar como la cantidad de inóculo influye en la capacidad o velocidad de replicación de las cepas de MYXV. Además, solo se han utilizado dos tiempos de infección, 0 y 96h, pero al tomar muestras a más tiempos se podrían determinar los momentos claves de la replicación viral, así como su dinámica.

Por otro lado, solo se pudo realizar un análisis estadístico de los resultados del título viral, y en ese caso el reducido número de muestras (solo duplicados) hace que el análisis no tenga suficiente peso estadístico. Por tanto, también sería adecuado aumentar el número de réplicas, por ejemplo, haciendo triplicados, para obtener resultados más robustos.

También sería interesante hacer un análisis más profundo de la expresión génica de genes tempranos y tardíos, no solo para eliminar dudas sobre si hay una capacidad de replicación reducida en las cepas SG33, VMI30, León162, 4604 y 6918 en células de liebre, sino para determinar de qué manera estas células interrumpen, impiden o limitan la replicación del MYXV, lo cual podría proporcionar información vital sobre cómo se ha conseguido producir el salto de especie del ha-MYXV a las liebres.

5. CONCLUSIONES

De este trabajo se pueden sacar varias conclusiones. Tanto las cepas virales vacunales homólogas (SG33, VMI30, León162), como las cepas atenuadas (4604, 6918) y la cepa vacunal heteróloga (virus del fibroma de Shope) aquí estudiadas son capaces de replicar *in vitro* en células RK13. Su título y número de genomas virales cuantificados por qPCR aumentaron en estas células pasadas 96h, aunque no en la misma proporción para cada cepa. Las cepas vacunales homólogas demostraron una mayor replicación en cultivo que las cepas atenuadas y la cepa vacunal heteróloga VFS.

No se ha encontrado evidencia de que dichas cepas puedan replicar en células HN-R y, por tanto, no parecen ser buenas candidatas para una futura vacuna para la mixomatosis en liebres. Además, no parece haber indicios de que los genes *M009L*, *M036L* y *M152R*, genes mutados en el ha-MYXV y en las cepas aquí estudiadas, proporcionen algún tipo de ventaja replicativa para los virus en células de liebre.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abade dos Santos, F. A., Carvalho, C. L., Monteiro, M., Carvalho, P., Mendonça, P., Peleteiro, M. da C., & Duarte, M. D. (2021). Recombinant myxoma virus infection associated with high mortality in rabbit farming (*Oryctolagus cuniculus*). *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*(4), 2616-2621. <https://doi.org/10.1111/tbed.13899>
- Abade dos Santos, F. A., Carvalho, C. L., Pinto, A., Rai, R., Monteiro, M., Carvalho, P., Mendonça, P., Peleteiro, M. C., Parra, F., & Duarte, M. D. (2020). Detection of Recombinant Hare Myxoma Virus in Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus algericus*). *Viruses*, *12*(10), 1127. <https://doi.org/10.3390/v12101127>
- Águeda-Pinto, A., Kraberger, S., Everts, A., Gutierrez-Jensen, A., Glenn, H. L., Dalton, K. P., Podadera, A., Parra, F., Martinez-Haro, M., Viñuelas, J. A., Varsani, A., McFadden, G., Rahman, M. M., & Esteves, P. J. (2022). Identification of a Novel Myxoma Virus C7-Like Host Range Factor That Enabled a Species Leap from Rabbits to Hares. *mBio*, *13*(2), e03461-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.03461-21>
- Arthur C.p & Louzis C. (1988). *La myxomatose du lapin en France: Une revue*. *7*(4), 937. <https://doi.org/10.20506/rst.7.4.385>

- Bárcena, J., Pagès-Manté, A., March, R., Morales, M., Ramírez, M. A., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & Torres, J. M. (2000). Isolation of an attenuated myxoma virus field strain that can confer protection against myxomatosis on contacts of vaccinates. *Archives of Virology*, 145(4), 759-771. <https://doi.org/10.1007/s007050050669>
- Barlow, A., Lawrence, K., Everest, D., Dastjerdi, A., Finnegan, C., & Steinbach, F. (2014). Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain. *The Veterinary Record*, 175(3), 75-76. <https://doi.org/10.1136/vr.g4621>
- Broyles, S. S. (2003). Vaccinia virus transcription. *Journal of General Virology*, 84(9), 2293-2303. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18942-0>
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J.-X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D., & McFadden, G. (1999). The Complete DNA Sequence of Myxoma Virus. *Virology*, 264(2), 298-318. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0001>
- Cavadini, P., Botti, G., Barbieri, I., Lavazza, A., & Capucci, L. (2010). Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis. *Vaccine*, 28(33), 5414-5420. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.017>
- Current ICTV Taxonomy Release | ICTV*. (s. f.). Recuperado 29 de junio de 2023, de <https://ictv.global/taxonomy>
- Dalton, K. P., Martín, J. M., Nicieza, I., Podadera, A., de Llano, D., Casais, R., Gimenez, S., Badiola, I., Agüero, M., Duran, M., Buitrago, D., Romero, L. J., García, E., & Parra, F. (2019). Myxoma virus jumps species to the Iberian hare. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(6), 2218-2226. <https://doi.org/10.1111/tbed.13296>
- Dalton, K. P., Nicieza, I., Baragaño, A., Alonso, J. M. M., & Parra, F. (2010). Molecular characterisation of virulence graded field isolates of myxoma virus. *Virology Journal*, 7(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-49>
- Dalton, K. P., Nicieza, I., de Llano, D., Gullón, J., Inza, M., Petralanda, M., Arroita, Z., & Parra, F. (2015). Vaccine breaks: Outbreaks of myxomatosis on Spanish commercial rabbit farms. *Veterinary Microbiology*, 178(3), 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.008>
- Dalton, K. P., Podadera, A., Alonso, J. M. M., Sanz, I. C., Rodríguez, Á. L. Á., Casais, R., Parra, F., Dalton, K. P., Podadera, A., Alonso, J. M. M., Sanz, I. C., Rodríguez, Á. L. Á., Casais, R., &

- Parra, F. (2021). Viral Disease in Lagomorphs: A Molecular Perspective. En *Lagomorpha Characteristics*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98272>
- Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
- Fenner, F. J. (1983). The Florey Lecture, 1983—Biological control, as exemplified by smallpox eradication and myxomatosis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 218(1212), 259-285. <https://doi.org/10.1098/rspb.1983.0039>
- Fenner, F., & Marshall, I. D. (1954). Passive immunity in myxomatosis of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): The protection conferred on kittens born by immune does. *The Journal of Hygiene*, 52(3), 321-336.
- Fenner, F., & Marshall, I. D. (1957). A comparison of the virulence for European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *Epidemiology & Infection*, 55(2), 149-191. <https://doi.org/10.1017/S0022172400037098>
- Fenner, F., Marshall, I. D., & Woodroffe, G. M. (1953). Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits: I. Recovery of Australian wild rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*) from myxomatosis under field conditions. *Epidemiology & Infection*, 51(2), 225-244. <https://doi.org/10.1017/S0022172400015655>
- Fenner, F., & Ratcliffe, F. N. (1965). Myxomatosis. *Myxomatosis*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19662205078>
- Giban, J., Barthelemy, J., & Aubry, J. (1956). L'épizootie de myxomatose en France chez le lapin de garenne (*oryctolagus cuniculus* L.). *Revue d'Écologie (La Terre et La Vie)*, 10(3), 167-178. <https://doi.org/10.3406/revec.1956.3830>
- Guerin, J.-L., Gelfi, J., Camus, C., Delverdier, M., Whisstock, J. C., Amardeihl, M.-F., Py, R., Bertagnoli, S., & Messud-Petit, F. (2001). Characterization and functional analysis of Serp3: A novel myxoma virus-encoded serpin involved in virulence. *Journal of General Virology*, 82(6), 1407-1417. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-6-1407>
- Jeřábek, J., & Dedek, L. (1981). Titration of the Shope Fibroma Virus in vitro. *Acta Veterinaria Brno*, 50(1-2), 89-96. <https://doi.org/10.2754/avb198150010089>

- JL. Guerin, F. Petit, A. Van Es, J. Gelfi, R. Py, S. Bertagnoli, & C. Boucraut Baralon. (1998). Analyse moléculaire des souches vaccinales SG33 et Poxlap du virus myxomateux: Implications prophylactiques et épidémiologiques. *Cunicole Fr., Lyon*.
- Kerr, P. J. (2012). Myxomatosis in Australia and Europe: A model for emerging infectious diseases. *Antiviral Research, 93*(3), 387-415.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.01.009>
- Kerr, P. J., Hone, J., Perrin, L., French, N., & Williams, C. K. (2010). Molecular and serological analysis of the epidemiology of myxoma virus in rabbits. *Veterinary Microbiology, 143*(2), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.025>
- Kerr, P. J., Liu, J., Cattadori, I., Ghedin, E., Read, A. F., & Holmes, E. C. (2015). Myxoma Virus and the Leporipoxviruses: An Evolutionary Paradigm. *Viruses, 7*(3), 1020-1061.
<https://doi.org/10.3390/v7031020>
- Macen, J. L., Upton, C., Nation, N., & McFadden, G. (1993). SERP1, a Serine Proteinase Inhibitor Encoded by Myxoma Virus, Is a Secreted Glycoprotein That Interferes with Inflammation. *Virology, 195*(2), 348-363. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1385>
- Marshall, I. D. (1959). The influence of ambient temperature on the course of myxomatosis in rabbits. *The Journal of Hygiene, 57*(4), 484-497.
- McCabe, V. J., & Spibey, N. (2005). Potential for broad-spectrum protection against feline calicivirus using an attenuated myxoma virus expressing a chimeric FCV capsid protein. *Vaccine, 23*(46), 5380-5388. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.05.038>
- McFadden, G. (2005). Poxvirus tropism. *Nature Reviews Microbiology, 3*(3), Article 3.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1099>
- Morales, M., Ramírez, M. A., Cano, M. J., Párraga, M., Castilla, J., Pérez-Ordoyo, L. I., Torres, J. M., & Bárcena, J. (2009). Genome Comparison of a Nonpathogenic Myxoma Virus Field Strain with Its Ancestor, the Virulent Lausanne Strain. *Journal of Virology, 83*(5), 2397-2403. <https://doi.org/10.1128/JVI.02189-08>
- Mossman, K., Lee, S. F., Barry, M., Boshkov, L., & McFadden, G. (1996). Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. *Journal of Virology, 70*(7), 4394-4410. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.7.4394-4410.1996>

- Myers, K. (1954). Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits: II. Field experiments, August–November 1950, and the first epizootic of myxomatosis in the riverine plain of south-eastern Australia. *Epidemiology & Infection*, *52*(1), 47-59.
<https://doi.org/10.1017/S0022172400027248>
- Petit, F., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Fassy, F., Boucraut-Baralon, C., & Milon, A. (1996). Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 beta-converting enzyme. *Journal of Virology*, *70*(9), 5860-5866.
<https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.5860-5866.1996>
- Picoux, J. B. (1991). Datos recientes sobre mixomatosis: Vacunas homólogas y heterólogas. *Boletín de Cunicultura*, *56*, 29-36.
- Santos, F. A. A. dos, Carvalho, C. L., Valente, P. C. L. G., Armés, H., Reemers, S. S., Peleteiro, M. C., Calonge Sanz, I., Dalton, K. P., Parra, F., & Duarte, M. D. (2022). Evaluation of Commercial Myxomatosis Vaccines against Recombinant Myxoma Virus (ha-MYXV) in Iberian Hare and Wild Rabbit. *Vaccines*, *10*(3), Article 3.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10030356>
- Schweneker, M., Lukassen, S., Späth, M., Wolferstätter, M., Babel, E., Brinkmann, K., Wielert, U., Chaplin, P., Suter, M., & Hausmann, J. (2012). The Vaccinia Virus O1 Protein Is Required for Sustained Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Promotes Viral Virulence. *Journal of Virology*, *86*(4), 2323-2336.
<https://doi.org/10.1128/JVI.06166-11>
- Smallwood, S. E., Rahman, M. M., Smith, D. W., & McFadden, G. (2010). Myxoma Virus: Propagation, Purification, Quantification, and Storage. *Current protocols in microbiology*, CHAPTER, Unit-14A.1.
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc14a01s17>
- Spiegschaert, B., McFadden, G., Hermans, K., Nauwynck, H., & Van de Walle, G. R. (2011). The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion. *Veterinary Research*, *42*(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-76>
- Stanford, M., Werden, S., & Mcfadden, G. (2007). Myxoma virus in the European rabbit: Interactions between the virus and its susceptible host. *Veterinary Research*, *38*(2), 299. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006054>



Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J., Nandra, S. K., & Privé, G. G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biology*, 6(10), R82.
<https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-10-r82>

Willer, D. O., McFadden, G., & Evans, D. H. (1999). The Complete Genome Sequence of Shope (Rabbit) Fibroma Virus. *Virology*, 264(2), 319-343.
<https://doi.org/10.1006/viro.1999.0002>

Zhang, L., Villa, N. Y., & McFadden, G. (2009). Interplay between poxviruses and the cellular ubiquitin/ubiquitin-like pathways. *FEBS Letters*, 583(4), 607-614.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.01.023>