

Evaluación de la rata (cepa Holtzman) como modelo de infección experimental para el virus de la leucosis bovina

Evaluation of the rat (Holtzman strain) as an experimental infection model for bovine leukosis

Renato Vignati¹, Luis Ruiz-García², Milena Montenegro³, Rocio Sandoval-Monzón^{1*}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue comprobar si las ratas de la cepa Holtzman se pueden infectar con el virus de la leucosis bovina enzoótica (VLB), cuando reciben por vía oral e intraperitoneal inóculos de sangre y calostro proveniente de bovinos infectados por el virus. Esto con la finalidad de encontrar nuevas especies de animales que puedan emplearse en los bioensayos y que brinden facilidades en el manejo en comparación a la especie ovina. Se trabajó con 28 ratas de la cepa Holtzman y 8 ovinos mestizos que se emplearon como grupo control. Las 28 ratas fueron distribuidas en tres grupos experimentales: i) 8 ratas inoculadas con sangre por vía intraperitoneal, ii) 10 ratas inoculadas con sangre por vía oral y iii) 10 ratas inoculadas con calostro por vía oral. El grupo control de ovinos fue inoculado con sangre por vía intraperitoneal. El inóculo fue preparado a partir de las muestras de sangre y calostro provenientes de una vaca diagnosticada como serológicamente positiva al VLB y con linfocitosis persistente. De la muestra de sangre se separó la capa flogística para preparar el inóculo y la muestra de calostro se diluyó para obtener la concentración deseada y fue inoculada directamente. Todos los animales

¹ Departamento de Salud Animal y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Departamento de Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú
* E-mail: rocio.sandoval@unmsm.edu.pe

Recibido: 27 de mayo de 2022

Aceptado para publicación: 30 de noviembre de 2022

Publicado: 27 de febrero de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

fueron confirmados como seronegativos al VLB. Después de la inoculación se realizó un seguimiento a la tercera y sexta semana empleando el kit INgezim BLV Compac 2.0 para comprobar si hubo seroconversión. No se encontró infección en ninguno de los grupos inoculados por vía oral, en tanto que 12.5% (1 individuo) resultó positivo en el grupo de ratas inoculado por vía intraperitoneal, mientras que el 100% de los ovinos seroconvirtió a la tercera semana. Hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control. Se puede concluir que la rata, cepa Holtzman, no resultó ser adecuada para la infección experimental o bioensayo con el virus de leucosis bovina (VLB) con los métodos de inoculación utilizados.

Palabras clave: modelo experimental, ratas, leucosis enzoótica bovina, seropositividad

ABSTRACT

The aim of this study was to verify if rats of the Holtzman strain can be infected with the enzootic bovine leukosis virus (VLB) when they receive blood and colostrum inocula from bovines infected by the virus via orally and intraperitoneally. This is to find new species of animals that can be used in bioassays and that provide management facilities compared to the ovine species. For this, 28 rats of the Holtzman strain were used plus 8 crossbred sheep that were used as a control group. The 28 rats were distributed into three experimental groups: i) 8 rats inoculated with blood intraperitoneally, ii) 10 rats inoculated with blood orally, and iii) 10 rats inoculated with colostrum orally. The control group of sheep was inoculated with blood intraperitoneally. The inoculum was prepared from blood and colostrum samples from a cow diagnosed as serologically positive for VLB and with persistent lymphocytosis. The phlogistic layer was separated from the blood sample to prepare the inoculum and the colostrum sample was diluted to obtain the desired concentration and was directly inoculated. All animals were confirmed as VLB seronegative. After inoculation, follow-up was carried out at the third and sixth week using the INgezim BLV Compac 2.0 kit to check if there was seroconversion. No infection was found in any of the groups inoculated orally, 12.5% (1 individual) was positive in the group of rats inoculated intraperitoneally, while 100% of the sheep seroconverted at the third week. There were significant differences between the experimental groups and the control group. It can be concluded that the rat, Holtzman strain, was unsuitable for the experimental infection or bioassay with the bovine leukosis virus (VLB) with the inoculation methods used.

Key words: experimental model, rats, bovine leukaemia virus, seropositivity

INTRODUCCIÓN

El virus de la leucosis bovina (VLB) afecta básicamente al bovino (Thompson y Goodrich, 2018), pero se han realizado infecciones experimentales en otras especies como el ovino, que ha llegado a desarrollar linfosarcomas en un tiempo menor que el bovino (Kettmann *et al.*, 1984; Florins *et al.*,

2007). El ovino es una especie que facilita el manejo y estudio de la enfermedad en comparación con el bovino; sin embargo, se buscan otras especies para modelos experimentales que proporcionen más facilidades de manejo y sean más ventajosas para estudiar la enfermedad. Diversas enfermedades han sido estudiadas a partir de modelos experimentales con animales de laboratorio, incluyendo la leucosis enzoótica bovina (LEB) y

enfermedades que afectan a los humanos (Lairmore, 2014).

La infección experimental con el VLB se ha reportado en cabras, conejos, ratas y pollos (Kettmann *et al.*, 1984; Dimitrov *et al.*, 2013; Krasnikova *et al.*, 2019; Mori *et al.*, 2019). Se dispone, incluso, de una línea celular productora de virus a partir del bazo de ratas de cepa Wistar infectadas experimentalmente (Altanerová *et al.*, 1989).

El VLB tiene un tamaño de 60 a 125 nm, posee una envoltura, una cápside icosaédrica y un genoma ARN diploide de sentido positivo (Martinez *et al.*, 2018). Además, cuenta con dos proteínas de envoltura, la proteína SU (de superficie, glucoproteína gp51) y la TM (de transmembrana, glucoproteína gp30) codificadas por el gen viral *env* (Bai *et al.*, 2019; ICTV, 2021).

El genoma del VLB consiste en 8714 nucleótidos incluyendo los genes de las proteínas estructurales esenciales (Polat *et al.*, 2017; ICTV, 2021). Los genes de la proteína estructural y que codifican enzimas *gag*, *pro*, *pol* y *env* tienen roles esenciales e indispensables en el ciclo viral como la infectividad y la producción de viriones infecciosos. El receptor, transportador de aminoácidos catiónico 1 (CAT1) es una secuencia de proteína de 622 aminoácidos que ha sido identificado como un receptor de membrana en las células murinas para los virus de la leucemia murina, facilitando la entrada del virus en células de ratón y rata (Bai *et al.*, 2019) y se correlaciona con la susceptibilidad individual a la infección por el VLB. La expresión de CAT1 de varias especies demostró que no hay especificidad de especie para la infección por el VLB, implicando a CAT1 como un receptor funcional del VLB responsable de su amplio rango de hospederos *in vitro* (Sato *et al.*, 2020).

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue demostrar la infección experimental con el VLB en ratas de la cepa Holtzman para ob-

tener una especie alternativa que brinde más facilidades económicas, de manejo y tiempo, donde se puedan realizar diversos estudios sobre la leucosis enzoótica bovina, como la evaluación de vías de infección, tratamientos y vacunas, entre otros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

La investigación se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, durante los meses de enero a marzo de 2020.

Animales

Para la preparación el inóculo se empleó una vaca con linfocitosis persistente y seropositiva al virus de Leucosis Enzoótica Bovina (Sandoval-Monzón *et al.*, 2021). Como unidades experimentales se utilizaron 28 ratas de la cepa Holtzman mayores de 2 meses y 8 ovinos criollos de 3 a 4 meses, todos con seronegatividad al VLB comprobada mediante el diagnóstico con la prueba comercial INgezim BLV Compac 2.0, kit de inmunoensayo de competición basado en la utilización de anticuerpos monoclonales específicos de la gp51 del VLB (Sensibilidad 100%, Especificidad 100%), requerido por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). Las ratas fueron situadas en un ambiente controlado con temperatura de 24 °C y 70% de humedad relativa. Los ovinos del grupo control fueron criados en corrales en condiciones de ambiente.

Tamaño Muestral

Se trabajó con un tamaño mínimo de ocho animales por grupo para tener un poder de prueba del 80% y un error tipo I de 5%. Estos valores fueron calculados empleando la fórmula para la determinación de tamaño de muestra para la comparación de dos pro-

porciones relacionadas, para lo que se empleó el software GRANMO v. 7.12. Los valores referenciales empleados se basan en que el 100% de los animales inoculados con el virus de la leucosis bovina desarrollan seropositividad y que, al inicio del estudio, todos los animales son seronegativos.

Preparación del Inóculo

Se colectaron 450 ml de sangre de la vaca seropositiva al VLB. La sangre fue centrifugada a 2800 x g durante 15 min. La capa flogística fue extraída y suspendida en buffer de fosfato salino (PBS) hasta obtener 10 ml. Se cuantificó la cantidad de leucocitos de la muestra, y se calculó el volumen a ser inoculado (inóculo) de modo que contenga 30×10^7 leucocitos. Para el conteo de los leucocitos se usó el diluyente Turk y la cámara de Neubauer. Para el caso del inóculo del calostro, se colectaron 2 L de calostro de una vaca recién parida, se cuantificó igualmente la cantidad de leucocitos y calculó el volumen a ser inoculado (inóculo) de modo que contenga 3×10^7 células. El conteo de los leucocitos en el calostro se realizó en 10 μ l de la suspensión, la cual fue extendida en 1 cm² de una lámina portaobjetos, que fue teñida con una solución alcohólica de azul de metileno al 0.3% y visualizada a 1000x.

Diseño Experimental

- Se trabajó con cuatro grupos experimentales:
- Grupo rata – sangre intraperitoneal: Aplicación del inóculo (30×10^7 leucocitos suspendidos en 0.5 ml) en ocho ratas vía IP.
 - Grupo rata - sangre oral: Aplicación del inóculo (30×10^7 leucocitos suspendidos en 0.5 ml) de sangre vía oral en 10 ratas.
 - Grupo rata – calostro oral: Aplicación del inóculo (3×10^7 leucocitos suspendidos en 1.0 ml) de sangre vía oral en 10 ratas.
 - Grupo ovino – sangre intraperitoneal: Aplicación del inóculo (30×10^7 leucocitos suspendidos en 0.5 ml) vía IP en ocho ovejas.

La inoculación del inóculo vía intraperitoneal se hizo en el abdomen posterior (Hem *et al.*, 1998) y en los ovinos en el centro del triángulo correspondiente a la fosa paralumbar derecha. Para la administración vía oral del inóculo, se sujetaron a las ratas por el dorso y se colocó la jeringa en la boca del animal administrándole lentamente el inóculo, esperando que lo degluta voluntariamente.

Muestras de Sangre

Las tomas de sangre se realizaron a los 0, 21 y 42 días de la inoculación para determinar la seropositividad al VLB.

La toma de sangre de las ratas se hizo por la vena safena. Los animales fueron inmovilizados con una manga con forma de embudo. El operario inmovilizó el miembro pélvico de tal forma que quede extendido y a la vez realizó la hemostasia ejerciendo una ligera presión por encima de la articulación de la rodilla (Hem *et al.*, 1998). Se desinfectó la zona con alcohol, se aplicó vaselina para evitar la expansión de la sangre para permitir que se formen gotas de sangre que pudieron ser colectadas directamente. Para la punción se utilizó una aguja 22 x 1". Se colectó entre 250 a 500 μ l, considerando que cada cuatro semanas se puede extraer, como máximo, el 20% del total de volumen sanguíneo del animal (Diehl *et al.*, 2001).

La toma de sangre en los ovinos se realizó mediante punción de la vena yugular. Se empleó una aguja 20 x 1' y tubos colectores sin anticoagulante (BD Vacutainer®). Luego de 30 min para permitir la formación del coágulo fueron centrifugadas a 2000 x g por 5 min. El suero resultante fue almacenado en viales.

Análisis de la Información

Para el análisis estadístico se empleó el software RStudio v. 4. Se calculó la frecuencia semanal de animales seropositivos a gp51.

Cuadro 1. Animales seropositivos a la prueba de ELISA (INgezim BLV Compac 2.0) para determinar anticuerpos monoclonales específicos de la gp51 del virus de leucemia bovina (VLB)

Día	Ovino	Rata	Rata	Rata
	Sangre-intraperitoneal (n=8)	Sangre-intraperitoneal (n=8)	Sangre- oral (n=10)	Calostro- oral (n=10)
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
21	6 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
42	8 ^b	1 ^a	0 ^a	0 ^a

^{a,b} Letras diferentes dentro de filas indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Para comparar la frecuencia semanal de los animales seropositivos a gp51, se empleó la función Fisher *multcomp*, comparando los resultados obtenidos dentro de cada semana. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia del 5%.

Consideraciones Éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según constancia N.º 2020-7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo se presentan en el Cuadro 1. Todos los animales (ratas y ovinos) se encontraron seronegativos en el día de la inoculación (día 0). El grupo ovino – sangre intraperitoneal, que participó como grupo control positivo, presentó seroconversión en el 75% (6/8) de los ovinos a los 21 días y de 100% a los 42 días de la inoculación, siendo estos resultados significativamente diferentes a los resultados de los demás grupos. Los resultados comprueban una vez más que el bioensayo ovino es un método efectivo para el estudio de infecciosidad del BLV (Kenyon *et al.*, 1981; Gutierrez y Forletti, 2016).

Los grupos de ratas que emplearon la vía oral (sangre y calostro orales) no presentaron animales seropositivo en las tres muestras. Los resultados indican que la vía de administración resulta inviable para lograr la infección con VLB; sin embargo, Krasnikova *et al.* (2019) pudo demostrar que es posible infectar a las ratas con VLB por medio de la vía oral utilizando como inóculo leche de vaca infectada. La cepa de ratas empleada en ese experimento fue Wistar y en el presente estudio fue Holtzman; además, en dicho estudio las ratas recibieron el inóculo a base de leche fresca en forma diaria y por 3-6 meses.

En el grupo rata - sangre intraperitoneal se encontró que un individuo presentó seroconversión (1/8, 12.5%) a los 42 días post inoculación, aunque sin diferencias significativas con los otros dos grupos de ratas. En un estudio similar, Dimitrov *et al.* (2013) tuvieron seropositividad en el 34% de 32 ratas Wistar inoculadas; sin embargo, usando doble inoculación con 10 días de intervalo.

Los resultados del presente estudio tampoco fueron concordantes con el trabajo de Altanerová *et al.* (1989), donde no solo logró la seropositividad en las ratas inoculadas, sino que llegó a establecer una línea celular productora de virus a partir del bazo de las ratas infectadas. En ese estudio se utilizaron ratas

Wistar adultos de ambos sexos, con una única dosis de inoculación vía IP o subcutánea; y con un inóculo de un clon celular derivado de células renales de feto de cordero infectado (20×10^6 células).

Además de las diferencias con las metodologías empleadas entre los trabajos de investigación de referencia y este estudio, se encuentra la cepa animal utilizada como factor probable por no haber logrado la infectividad, donde en este estudio se trabajó con ratas Holtzman y los estudios de referencia trabajaron con Wistar (Alteranová *et al.*, 1989; Dimitrov *et al.*, 2013). A pesar de que la rata es el animal de laboratorio más utilizado en distintos campos de investigación, existen cepas de ratas que son utilizadas para fines específicos, tales como bioensayos o modelos experimentales, debido a que estas cepas tienen características fisiológicas, inmunológicas y bioquímicas que ayudan al correcto desarrollo de esas investigaciones (Johnson, 2012).

En el presente estudio se utilizó la cepa Holtzman, a diferencia de la cepa Wistar utilizada por otros investigadores, debido principalmente por su disponibilidad. No obstante, se tenía además el fundamento teórico para sustentar su uso en el experimento, ya que los receptores para el VLB no son de especie específica; sin embargo, no se logró la infectividad. La cepa Wistar es la más utilizada como biomodelo en distintos campos de investigación, tales como oncología, inmunología, toxicología, entre otros, principalmente debido a características propias de la cepa, tales como como la proliferidad y la resistencia a ciertos patógenos (Mourelle *et al.*, 2013).

También se podría considerar que la calidad del inóculo podría ser inadecuada; sin embargo, en el grupo control positivo (ovinos) se utilizó el mismo inóculo obteniendo una seroconversión del 100%, lo cual demuestra que, tanto la carga viral empleada como el inóculo, debieron ser suficientes para generar una respuesta de seroconversión en los grupos experimentales.

CONCLUSIONES

- La especie rata, cepa Holtzman, no resultó ser adecuada para la infección experimental o bioensayo con el virus de leucosis bovina (VLB) con los distintos métodos de inoculación.
- Se confirma la susceptibilidad de la especie ovina para la infección experimental con VLB mediante la vía intraperitoneal con sangre de una vaca con LEB.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo incondicional de los profesionales: MV Dante Vara Márquez, MV Shirley Arista Arista y MV Karla Arévalo Rodríguez.

LITERATURA CITADA

1. **Altanerová V, Portetelle D, Kettmann R, Altaner C. 1989.** Infections of rats with bovine leukaemia virus: establishment of a virus-producing rat cell line. *J Gen Virol* 70: 1929-1932. doi: 10.1099/0022-1317-70-7-1929
2. **Bai L, Sato H, Kubo Y, Wada S, Aida Y. 2019.** CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection. *FASEB J* 33: 14516-14527. doi: 10.1096/fj.201901528R
3. **Diehl KL, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vorstenbosch CVD. 2001.** A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 21: 15-23. doi: 10.1002/jat.727
4. **Dimitrov P, Todorova K, Milcheva R, Gabev E, Russev R. 2013.** BLV infected rats and rabbits as a model of human lymphocytic leukaemia. In: *Proc IV Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research*. Sofia: Bulgarian Academy of Sciences.

5. **Florins A, Gillet N, Boxus M, Kerkhofs P, Kettmann R, Willems L. 2007.** Even attenuated bovine leukemia virus proviruses can be pathogenic in sheep. *J Virol* 81: 10195-10200. doi: 10.1128/JVI.01058-07
6. **Gutierrez SE, Forletti A. 2016.** Bovine leukemia virus. In: *Molecular detection of animal viral pathogens*. CRC Press. p 15-166.
7. **Hem A, Smith AJ, Solberg P. 1998.** Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab Animal* 32: 364-368. doi: 10.1258/002367798780599866
8. **[ICTV] International Committee on Taxonomy of Virus. 2021.** *Retroviridae*. [Internet]. Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/>
9. **Johnson M. 2012.** Ratones y ratas de laboratorio. New Jersey, USA: Synatom Research. [Internet]. Disponible en: <https://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>
10. **Kenyon S, Ferree J, McFeely R, Graves D. 1981.** Induction of lymphosarcoma in sheep by bovine leukemia virus. *J Natl Cancer Inst.* 67: 1157-1163.
11. **Kettmann R, Mammerickx M, Portetelle D, Grégoire D, Burny A. 1984.** Experimental infection of sheep and goat with bovine leukemia virus: localization of proviral information in the target cells. *Leukemia Res* 8: 937-944. doi: 10.1016/0145-2126(84)90047-x
12. **Krasnikova ES, Bouchemla F, Krasnikov AV, Radionov RV, Belyakova AS. 2019.** The hematobiochemical status of Wistar rat line under the bovine leukemia virus experimental infection. *Vet World* 12: 382-388. doi: 10.14202/vetworld.2019.382-388
13. **Lairmore MD. 2014.** Animal models of bovine leukemia virus and human T-lymphotrophic virus type-1: insights in transmission and pathogenesis. *Annu Rev Anim Biosci* 2: 189-208. doi: 10.1146/annurev-animal-022513-114117
14. **Martinez L, Lendez PA, Farias MVN, Dolcini GL, Ceriani MC. 2018.** Can bovine leukemia virus be related to human breast cancer? review of the evidence. *J Mammary Gland Biol* 23: 101-107. doi: 10.1007/s10911-018-9397-z
15. **Mori H, Tomiyasu T, Nishiyama K, Matsumoto M, Osawa Y, Okazaki K. 2019.** L233P mutation in the bovine leukemia virus Tex protein depresses endothelial cell recruitment and tumorigenesis in athymic nude mice. *Arch Virol* 164: 1343-1351. doi: 10.1007/s00705-019-04191-3
16. **Mourelle A, Herrero E, Ricca M. 2013.** Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. Buenos Aires: Spei Domus 9: 39-47.
17. **Polat M, Takeshima S, Aida Y. 2017.** Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J* 14: 209. doi: 10.1186/s12985-017-0876-4
18. **Sandoval-Monzón RS, Arévalo-Rodríguez ICK, Carrillo-Torres AA, Ruiz-García LF. 2021.** Efficacy of physical and chemical treatments on the inactivation of bovine leukosis virus present in milk. *Clin Exp Vaccine Res* 10: 52-58. doi: 10.7774/cevr.2021.10.1.52
19. **Sato H, Bai L, Borjigin L, Aida Y. 2020.** Overexpression of bovine leukemia virus receptor SLC7A1/CAT1 enhances cellular susceptibility to BLV infection on luminescence synsytium induction assay (LuSIA). *Virol J* 17: 57. doi: 10.1186/s12985-020-01324-y
20. **Thompson BS, Goodrich EL. 2018.** Miscellaneous infectious diseases. In: Peek SF, Divers TJ, (eds). *Rebhun's diseases of dairy cattle*. 3rd ed. Missouri: Elsevier. p 760-769.