

Tesis de Posgrado

Morfogénesis del virus de la fiebre aftosa

Gómez Yafal, Alicia

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gómez Yafal, Alicia. (1983). Morfogénesis del virus de la fiebre aftosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1761_GomezYafal.pdf

Cita tipo Chicago:

Gómez Yafal, Alicia. "Morfogénesis del virus de la fiebre aftosa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1761_GomezYafal.pdf

Tesis 1761

Ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MORFOGENESIS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Alicia Gómez Yafal

Director de Tesis Dr. Eduardo Lucio Palma

DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA

TESIS PRESENTADA

PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

1983

1761
ej.2

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Eduardo L. Palma por su invalorable dirección científica.

Al Dr. Osvaldo A. Peso por su valioso apoyo a lo largo del desarrollo de esta tesis.

ABREVIATURAS

BHK: baby hamster kidney, línea celular de riñón de hámster
cDNA: copia de ácido desoxirribonucleico
DMSO: dimetilsulfóxido
DOC: deoxicolato de sodio
EDTA: etilén diamin tetraacetato de sodio
EMC: virus de la encefalomiocarditis
MEM: medio mínimo de Eagle
NP₄₀: Nonidet P₄₀
p.i.: post - infección
PPO: 2,5-difeniloxazol
RFB: cultivo celular de riñón fetal bovino
RNA: ácido ribonucleico
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
tRNA: ácido ribonucleico de transferencia
RNAsa: ribonucleasa
RSB: reticulocyte standard buffer, buffer hipotónico
SAT: South African Territories, denominación dada a ciertos sero-
tipos del virus de la Fiebre Aftosa
SDS: dodecil sulfato de sodio
TCA: ácido tricloroacético
TLCK: tosil - lisil - clorometil cetona
VP: proteína viral
VPg: viral protein genome linked, proteína viral asociada al RNA

INDICE DE TEMAS

	Página
INTRODUCCION	
Breve reseña histórica	1
Aspectos clínicos de la enfermedad	1
Modo de transmisión	3
La distribución de la Fiebre Aftosa en el mundo	5
La Fiebre Aftosa y la política sanitaria en la República Argentina	6
- política de riesgo cero	7
- política de riesgo mínimo	7
El virus de la Fiebre Aftosa	
a) propiedades fisicoquímicas y biológicas	9
b) ciclo replicativo	14
Aspectos inmunológicos y prevención de la Fiebre Aftosa	
Vacunación	16
a) vacunas inactivadas	17
b) vacunas atenuadas	18
c) otros tipos de vacunas en desarrollo	19
INTRODUCCION ESPECIFICA	21
OBJETIVOS Y DESARROLLO	27

PARTE IETAPAS TEMPRANAS DE LA MORFOGENESIS DEL VIRUS DE LA
FIEBRE AFTOSA

MATERIALES Y METODOS

Células y medios	28
Cepa viral	28
Buffers y soluciones	29
Procesamiento del material de vidrio y teflon	30
Infección y procedimientos de marcación radioactiva	31
Precisión en el momento de agregado de ^3H - leucina	32
Duración del pulso de ^3H - leucina	35
Procesamiento de muestras	35
Cuantificación de la radioactividad	37
Electroforesis en geles de poliacrilamida	38
Fluorografía	39
Comprobación de la eficiencia metodológica	39
Drogas y radioisótopos	43

RESULTADOS

Detección de un intermediario morfogenético de bajo coeficiente de sedimentación	44
Caracterización fisicoquímica del intermediario de coeficiente de sedimentación 10 S	47

	Página
Análisis electroforético del intermediario morfo-genético	52
<u>PARTE II</u>	
<u>ETAPAS TARDIAS DE LA MORFOGENESIS DEL VIRUS DE LA</u>	
<u>FIEBRE AFTOSA</u>	
MATERIALES Y METODOS	
Células y medios	59
Cepa viral	59
Buffers y soluciones	59
Procesamiento de muestras	59
RESULTADOS	
Purificación de virus y procápsides en experimen- tos de pulso y posterior dilución de la marca	62
Pasaje de radioactividad de procápsides a virio- nes en experimentos de pulso y posterior dilu- ción de la marca	66
El pasaje de procápsides a viriones en presencia de ciclohexitimida	82
Efecto de los inhibidores proteolíticos sobre la morfo-génesis del virus de la Fiebre Aftosa	86

	Página
DISCUSION	90
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFIA	104

INTRODUCCION

Breve reseña histórica

En 1514 fue descrito en Italia un brote de enfermedad en ganado con características tales que permiten suponer que se trató de Fiebre Aftosa. H. Fracastorius señaló en esa ocasión que los animales rechazaban su alimento pues su cavidad bucal estaba recubierta internamente por pequeñas vesículas rojas que más adelante se localizaban también en las patas (1).

Asimismo, existen referencias que indican que ya los griegos se habrían ocupado de esta enfermedad. Sin embargo, no fue sino hasta 1897 que Loeffler y Frosch (2) demostraron que el agente causante de la misma era un virus.

A la República Argentina habría llegado desde Europa al promediar la segunda mitad del siglo pasado, a través de importaciones de ganado. Produjo graves daños e inclusive perturbaciones en los embarques de hacienda en pie, los cuales, junto con el tasajo y las carnes en salmuera constituían la forma de exportar nuestra riqueza ganadera en aquella época.

Aspectos clínicos de la enfermedad

El virus de la Fiebre Aftosa causa una enfermedad muy contagiosa en animales rumiantes y biungulados. El ganado bovino, porcino, ovino y caprino es susceptible en ese orden decreciente.

En bovinos se observan vesículas en la lengua, patas (zona por

encima de las pezuñas) y ubre. Al evolucionar la enfermedad, el animal despidе saliva espumosa y el cuadro bucal se agrava con desprendimiento de la cubierta epitelial en las zonas afectadas. Esto facilita la infección por bacterias de las áreas expuestas.

Al practicar necropsia, pueden ser detectadas lesiones en corazón, rumen, páncreas, etc.

En cerdos, las regiones más afectadas son las patas y el morro. En ovejas, cabras y ciervos pueden pasar desapercibidos los daños bucales y los síntomas de la enfermedad aparecen en las patas.

La mortalidad es inferior al 10% y ocurre preferentemente entre animales jóvenes, terneros y lechones, que entre adultos.

La mayor parte del ganado enfermo sana en relativamente poco tiempo, salvo aquellos casos de lesiones crónicas cardíacas, de la ubre o de los miembros. No obstante, las consecuencias económicas son cuantiosas ya que decrece el peso del animal porque el dolor que padece le impide trasladarse y alimentarse, se pierde la ocasión de realizar ventas y se corre el riesgo de que se produzcan abortos.

Los animales susceptibles de ser infectados experimentalmente con este virus son cobayos, hamsters, ratones, conejos, ratas, pollos, patos, gansos y pavos (3).

Modo de transmisión

El virus de la Fiebre Aftosa posee una gran capacidad para difundirse entre el ganado. Su velocidad de transmisión en muchas ocasiones supera lo calculable y se asiste al contagio rápido de la enfermedad de un animal a otro o bien entre establecimientos linderos en pocos días y hasta en horas.

Existen tres factores que desempeñan un rol importante al impedir o facilitar el desarrollo de una onda epidémica en un campo o una zona: el medio, la población susceptible y el agente.

El agente puede hallarse en la saliva durante el período de incubación, o sea horas antes de la aparición de los síntomas. Su eliminación en grandes cantidades a través de secreciones y excreciones (orina, heces, saliva, leche, lágrimas y semen) ocurre sobre todo al comienzo de la fase febril; esto continúa produciéndose durante días y aún después de transcurrida la fase clínica.

En nuestro medio, con explotación pecuaria extensiva y bajas densidades ganaderas por superficie en comparación con Europa, el movimiento animal constituye el mejor medio para la transmisión del virus.

En Argentina esta circulación puede estimarse en 20 millones de cabezas de ganado por año, considerando ventas directas, cambios de campo por pastoreo o invernada, hacienda en viaje hacia el mercado o la feria y en general toda aquella que transita en

arreos o camiones.

Aún si se estima que el 80% del ganado vacuno está protegido mediante la vacunación, quedan unos 3 ó 4 millones de animales que circulan con baja protección inmunológica o sin ella y poseen riesgo de contactar el virus en algún momento de su tránsito.

Cuando se faenan animales que están incubando la enfermedad y por ello han escapado a la inspección veterinaria previa, las carnes son un medio de diseminación del virus. Aunque las manifestaciones clínicas no se observan, el agente infeccioso puede ser hallado en todo el organismo con excepción del sistema nervioso.

Cuando las medias reses son refrigeradas, decae el pH en músculo y en un corto lapso, la mayor parte del virus se inactiva. Sin embargo, el agente infeccioso permanece en nódulos linfáticos y médula ósea aún después de seis meses. El congelamiento rápido de las medias reses detiene el proceso de acidificación, lo que trae aparejado una buena conservación de virus en músculo.

Se ha observado que la supervivencia de virus en todo tipo de material es grande. Restos de animales, maderas, sangre seca, ropas contaminadas pueden servir como foco de diseminación mediante animales salvajes, personas, pájaros, barcos, etc. En general, se acostumbra enterrar o incinerar los objetos sospechosos para evitar esta vía de transmisión.

Los portadores sanos son aquellos animales que, aparentemente recuperados de un brote infeccioso, continúan eliminando virus

durante períodos considerablemente largos lo que hace que puedan ocasionar una nueva epidemia de la enfermedad.

Ya en el año 1959 Van Bekkum (4) inoculó ratones y bovinos con fluido esófago - faríngeo de animales recuperados de una infección, pudiendo realizar el posterior aislamiento de virus de la Fiebre Aftosa. Este constituyó el primer aislamiento experimental de virus a partir de portadores sanos.

Numerosos experimentos han demostrado la modulación de la antigenicidad y virulencia sufrida por el virus de la Fiebre Aftosa luego del pasaje por portadores sanos (5) (6) (7). Este es uno de los factores que contribuyen a la alta variabilidad del virus pues nuevos subtipos pueden ser generados constantemente en áreas endémicas.

La distribución de la Fiebre Aftosa en el mundo

En Estados Unidos, el último brote de Fiebre Aftosa ocurrió en el año 1929. En Canadá se registró por última vez en 1952 mientras que en México se erradicó en 1953 gracias a una tarea conjunta con Estados Unidos que, obviamente, deseaba eliminar la enfermedad de su vecindad.

En Australia no se presentaron más denuncias sobre Fiebre Aftosa desde 1872 y en Japón no se registra desde 1908.

En Gran Bretaña el último caso había ocurrido en 1968 y a consecuencia del mismo, se produjo un cambio en la política sanitaria

impidiéndose la importación de carnes con hueso provenientes de países con Fiebre Aftosa endémica. Sin embargo, en 1981 existió un brote de la enfermedad ocasionado por virus proveniente de vacunas mal inactivadas (8).

Los países escandinavos son catalogados como libres de Fiebre Aftosa pues los registros más recientes son de casos producidos entre 1952 y 1966.

Nunca existió la enfermedad en Nueva Zelandia ni en América Central. Tampoco hay Fiebre Aftosa en la isla de Cuba ni en la mayoría de las del Caribe y la Polinesia.

En cuanto a nuestro país, la región de la Patagonia se halla libre de la enfermedad pero el reconocimiento de este hecho es sólo parcial: el Mercado Común Europeo lo acepta, aunque hay miembros que sólo reconocen como libres de Fiebre Aftosa la isla de Tierra del Fuego, mientras que Estados Unidos tiene la política de considerar a cada país como una totalidad.

La Fiebre Aftosa y la política sanitaria en la República Argentina

A causa de la Fiebre Aftosa, nuestro país tuvo inconvenientes en las exportaciones de ganado en pie al promediar la segunda mitad del siglo pasado. El establecimiento de frigoríficos hizo que no se presentaran nuevas dificultades sanitarias a nuestras carnes e inclusive, países libres de la enfermedad, aceptaban correr ciertos riesgos a cambio de tener alimentos a precios más reducidos.

Política de riesgo cero: Estados Unidos estableció en la década del 20 una estricta legislación sanitaria y cuando irrumpió en el mercado mundial de carnes luego de la Segunda Guerra Mundial, produjo un cambio fundamental en las corrientes comerciales beneficiando a Australia y Nueva Zelanda cuyas ganaderías estaban prácticamente estancadas.

A Estados Unidos se le sumaron luego Canadá, Japón, los países escandinavos y recientemente Corea del Sur, Filipinas, Taiwan, etc.

El mercado internacional cambió totalmente dividiéndose en dos: los que abastecían a los países libres de Fiebre Aftosa y los que vendían a los que aceptaban carnes de países con la enfermedad.

Hoy, aproximadamente la mitad del mercado mundial de carne vacuna establece restricciones para la venta de carne refrigerada proveniente de países con Fiebre Aftosa y en el caso de carnes ovinas llega a los dos tercios. Sólo podemos vender con todo destino carnes enlatadas cocidas y congeladas.

Política de riesgo mínimo: Luego del brote de Fiebre Aftosa del año 1968, Gran Bretaña decidió importar carnes refrigeradas a condición de que no lleven hueso. En 1977, Suiza y el Mercado Común Europeo también adoptaron esta política.

Cuando en Argentina se advirtió la importancia de los cambios que se producían en el mercado mundial de carnes a causa de la incorporación de Estados Unidos como importador, se redoblaron

los esfuerzos conducentes a la erradicación de la Fiebre Aftosa. Se estableció la obligatoriedad de la vacunación de bovinos y esta disposición rige hasta el presente. Desde entonces se han realizado mejoras en las vacunas, en los medios para controlarlas y se ha estimulado la conciencia del ganadero.

Asimismo, el plan piloto Hipólito Irigoyen desarrollado en el oeste de la provincia de Buenos Aires, constituyó una demostración de la eficacia de las medidas de administración sanitaria tan elementales como el aislamiento de los animales que ingresan a las explotaciones, el lavado de camiones, la vacunación, etc.

La formulación de la vacuna oleosa realizada en nuestro país provee inmunidad más prolongada y efectiva, lo que permite aplicarla a intervalos mayores y con mejores resultados.

El virus de la Fiebre Aftosa

a) Propiedades fisicoquímicas y biológicas

Los Picornavirus (pico: pequeño; RNA: ácido ribonucleico) son virus icosanédricos sin envoltura de diámetro comprendido entre 22 y 30 nm y cuyo genoma es ácido ribonucleico de cadena simple.

Según la clasificación de Cooper de 1978 (9), la familia Picornaviridae consta de cuatro géneros : Aftovirus, Cardiovirus, Rhinovirus y Enterovirus. Estos comparten muchas características comunes pero poseen diferencias importantes entre sí, fundamentalmente en cuanto a su estabilidad a bajos pH y su densidad de flotación en soluciones de ClCs.

Tanto los Enterovirus como los Cardiovirus son estables aún a pH inferior a 4, mientras que los Rhinovirus sufren inactivación por debajo de pH 5 y los Aftovirus son inestables a pH menor que 7 (10).

El comportamiento frente a la acidez puede ser correlacionado con la densidad de flotación en gradientes de ClCs: los virus ácido - estables poseen menor densidad de flotación que los ácido - lábiles. Así , tenemos valores de $1,34 \text{ g/cm}^3$ para la densidad de flotación de Enterovirus y Cardiovirus mientras que para Rhinovirus está comprendida entre $1,38 - 1,41 \text{ g/cm}^3$ y Aftovirus presenta $1,42 - 1,44 \text{ g/cm}^3$ (11).

La disparidad tanto en la susceptibilidad a pH como en el com-

portamiento en soluciones de ClCs seguramente está asociada a diferencias a nivel estructural y quizás morfológico.

El RNA de Cardiovirus y Aftovirus contiene una región de ácido policitidílico (poli - C) ausente en los otros dos miembros de la familia (12) (13). Su función aún no ha sido esclarecida pero se especula acerca de la posible relación entre la longitud del segmento y la virulencia.

El género Aftovirus comprende todos los tipos y subtipos del virus de la Fiebre Aftosa. Han sido identificados siete serotipos (14) de los cuales tres : A, O, C están presentes en América del Sur y Europa; en Asia predomina el Asia I, mientras que en Africa existen tres llamados SAT (South African Territories) 1, 2 y 3. Además, por pruebas de fijación de complemento se han determinado más de sesenta subtipos serológicos y miles de cepas diferentes.

El virus de la Fiebre Aftosa posee un coeficiente de sedimentación (S_{20,H_2O}) de 140 S determinado por ultracentrifugación analítica.

Presenta gran sensibilidad a la acidez; el rango de pH que le brinda mayor estabilidad es muy restringido y está comprendido entre 6,9 y 7,8. A pH menor, el virus se destruye dejando libre su ácido nucleico mientras su cápside se separa en pentámeros y parte de éstos también en monómeros. Por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de virus aftoso disociado se observa que

los pentámeros presentan un coeficiente de sedimentación de 12 S y los monómeros 5 S, como se indicará más adelante (página 40).

El ClCs ejerce influencia sobre la velocidad de sedimentación y la densidad de flotación de los viriones. Este efecto es debido a la unión de los iones Cs^+ con las partículas víricas (15) y puede ser revertido empleando una solución buffer libre del catión. La unión del Cs^+ corresponde a un proceso de intercambio iónico en el cual se produce el reemplazo por Cs^+ de cationes que se requieren para la neutralización de las cargas negativas de los 8.000 restos fosfato de la molécula de RNA (16).

La densidad de flotación de Aftovirus en solución de ClCs es la más elevada dentro de los Picornavirus (con excepción de Rhinovirus equino), de donde puede inferirse que la estructura del virión es tal que le permite un mayor intercambio de iones Cs^+ respecto del resto de los miembros de la familia.

Todos los Picornavirus poseen tres polipéptidos de tamaño similar: VP_1 , VP_2 y VP_3 y uno mucho más pequeño: VP_4 (17) (18) (19) (20) (21). Suelen contener en baja proporción un quinto polipéptido: VP_0 , precursor de VP_2 y VP_4 (22).

En el caso de Aftovirus se ha descrito que estas proteínas estructurales son fosforiladas (23) y que la proteína VP_4 se halla localizada internamente (24) (25). Además, se ha postulado una actividad de ribonucleasa asociada a viriones purificados (26).

La estructura de los viriones fue establecida una vez que se

desarrollaron métodos adecuados para la purificación y cristalización de los mismos (27) (28).

Los viriones son icosaedros que constan de sesenta subunidades idénticas ordenadas con simetría 5:3:2 según ha quedado determinado por los patrones de difracción obtenidos (29).

Las cápsides inusualmente compactas de los Picornavirus han complicado la determinación fina de la estructura viral por microscopía electrónica pues son esencialmente impenetrables por las sales de alta densidad electrónica, como el fosfotungstato, empleadas para tinción negativa.

Los estudios de microscopía electrónica para el virus de la Fiebre Aftosa mostraron una superficie granular compacta donde no fue posible distinguir capsómeros. Por ruptura a bajo pH "in situ" (en la grilla) se vieron casquetes esféricos que fueron correlacionados con las partículas de coeficiente de sedimentación 12 S obtenidas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa bajo similares condiciones experimentales (30).

El genoma consiste en una única molécula de ácido ribonucleico (RNA) compuesta de 8.000 bases aproximadamente y cuya masa representa el 31,5% de la masa total del virión (31) (32). El RNA está poliadenilado en su extremo 3' y posee un tracto de ácido citidílico (poli - C) de longitud variable en su extremo 5'.

Una pequeña proteína básica denominada VPg está ligada en forma covalente vía un residuo tirosina al uridilo del extremo 5' del

RNA por una unión fosfodiéster (33) (34) (35). La población de VPg aislada a partir de virus purificado es heterogénea y se han separado dos fracciones de diferentes cargas, mapas trípticos y composición de aminoácidos (36). Aún no se ha esclarecido el significado biológico de estos hechos. Recientemente se analizó la secuencia nucleotídica del cDNA (ácido desoxirribonucleico copia) clonado de virus de la Fiebre Aftosa con el fin de buscar las bases que podrían codificar para el péptido VPg. Se han identificado tres genes VPg ordenados en tándem que codifican para tres VPg que, aunque semejantes, son diferentes entre sí (37). Esta amplificación de genes es la primera registrada para un genoma viral.

A pesar de carecer de la estructura "cap" típica en mRNA eucarióticos, el genoma del virus de la Fiebre Aftosa sirve como mensajero tanto "in vivo" como "in vitro".

Existe un único sitio de iniciación de la traducción cercano al extremo 3' de poli - C (38) (39), por lo que la única región que se traduce es la comprendida entre este punto y el extremo 3' del genoma. El resultado es una poliproteína que es procesada por proteasas de la célula huésped para dar cuatro productos primarios (40) (41) (42) (43) : P_{20_a} , P_{88} , P_{52} y P_{100} (44) (45) (46) (47).

A continuación, una o más proteasas codificadas por el virus producen los clivajes que llevan a los productos finales; las proteínas estructurales se procesan a partir de P_{88} (48).

b) Ciclo replicativo

El proceso de replicación del virus de la Fiebre Aftosa se inicia con la adsorción del mismo a receptores lipoproteicos presentes en la membrana de la célula huésped. Este evento depende de la concentración de iones Ca^{++} (49) y su velocidad es función de la temperatura de incubación.

La unión de las partículas virales a los receptores está determinada por la frecuencia de colisiones entre virus y células (50).

La penetración implica gasto energético, por lo que presenta fuerte dependencia con la temperatura: no ocurre a temperatura inferior a 15°C y a 37°C se desarrolla en forma óptima (51).

La primera función viral que se lleva a cabo es la inhibición de la metilación en RNA 45 S (precursor ribosomal) y tRNA pertenecientes a la célula huésped. En consecuencia, la maquinaria biosintética celular queda a disposición del virus y desaparecen los polisomas celulares mientras que empiezan a visualizarse los virales, mucho más grandes.

El RNA se traduce como mensajero en una poliproteína que sufre sucesivos clivajes para dar proteínas estructurales y no estructurales. Entre estas últimas, la replicasa P_{56_a} que interviene en la replicación del genoma.

El proceso de ensamblaje de las proteínas estructurales y su unión con el RNA conduce a la formación de los viriones maduros (52).

Para infecciones de un solo ciclo (alta multiplicidad de infección) en células BHK₂₁, se sigue una curva sigmoidea donde el período de latencia es de aproximadamente 100 minutos y la liberación se lleva a cabo a partir de ese momento con una fase de crecimiento exponencial y una posterior reducción de la velocidad hasta alcanzar un plateau a las cuatro o cinco horas post-infección (p.i.) (53).

Aspectos inmunológicos y prevención de la Fiebre Aftosa

Los animales que se recuperan de la infección con un determinado tipo de virus, quedan inmunizados contra ese mismo tipo por un período que puede superar el año (54).

La inmunidad pasiva que adquieren las crías a través del calostro se prolonga por espacio de dos meses aproximadamente (55) (56).

La duración de la inmunidad está influenciada por la edad, condiciones alimentarias, estado de nutrición, especie animal, etc.

Los animales no expuestos a la enfermedad, pueden ser protegidos por inoculación de suero hiperinmune o de convalescientes que les conferirán inmunidad (pasiva) contra virus homólogo durante unas dos semanas.

Vacunación

En aquellos países como Argentina en los que la enfermedad es endémica, se adoptan las medidas de cuarentena - vacunación y vacunación sistemática. La primera consiste en aislar la zona afectada por Fiebre Aftosa y vacunar a todos los animales susceptibles de la misma y regiones circundantes,

La vacunación sistemática es obligatoria y se efectúa en fechas previamente establecidas por los organismos competentes.

Mediante una estricta campaña sanitaria se consigue circunscribir a la enfermedad a aquellos brotes ocasionados por nuevas

cepas que pudieran originarse debido a diversos factores que contribuyen a la gran variabilidad del virus de la Fiebre Aftosa.

a) Vacunas inactivadas

En el año 1938 apareció la primera vacuna efectiva a virus inactivado que fue obra de Schmidt (57) y Waldmann (58). El virus con que fue preparada provenía de las lesiones linguales del ganado infectado experimentalmente.

Se consiguió un gran avance cuando Frenkel (59) en 1951 logró la propagación "in vitro" de virus en epitelio lingual bovino.

La formulación de estas vacunas consiste en un primer paso de clarificación del virus (por filtración o bien por agitación con cloroformo) seguido de la adsorción del mismo a hidróxido de aluminio; luego se lleva hasta concentración final 0,5% con formalina y se completa con incubación a 26°C.

Posteriormente se introdujeron mejoras a esta formulación clásica mediante el empleo de saponina, glicerina, etc.

Para producción industrial de vacuna se comenzó a usar en 1960 el cultivo primario de riñón fetal bovino (RFB) en frascos de Roux y posteriormente en botellas rotantes. Este método posee la desventaja del trabajoso procesamiento de riñones; por otra parte, la producción viral no es abundante debido a las características de este cultivo (las células no confluyen sino que crecen en focos, por lo que la densidad celular es baja).

Finalmente, en 1962, con la introducción de la línea celular de riñón de hámster BHK₂₁ clon 13 (60) cultivada en monocapas (la concentración celular es ocho veces superior a RFB) o suspensión se lograron mejores rendimientos en la producción viral.

El empleo de inactivantes tales como acetiletlenimina (AEI) y etilenimina binaria (BEI) permite una mejor preservación de los determinantes antigénicos de la partícula viral, lo que redundo en una mayor efectividad de la vacuna.

Se ha comprobado en numerosas experiencias que el uso de adyuvante oleoso aumenta la eficiencia de las vacunas respecto de aquellas de formulación hidróxido - saponinada. (61) (62) (63) (64) (65). Esto ocurre porque permite la prolongación de la inmunidad y el nivel adecuado de anticuerpos se mantiene por espacio de siete meses y luego declina lentamente hasta los doce meses (66).

La utilización de la vacuna oleosa posibilita que se disminuya a dos el número de vacunaciones anuales, con las ventajas obvias que de ello se desprende : economía de millones de dosis de vacunas y menor movimiento de hacienda por año.

b) Vacunas atenuadas

El pasaje de virus por huéspedes tales como embrión de pollo (67), pollitos de 24 horas (68) (69), ratones lactantes (70), conejos (71), etc. produce atenuación de la virulencia para bo-

binos. A partir de este virus se elaboran las vacunas a virus vivo atenuado (72) (73) (74) (75).

Este tipo de vacunación tuvo su apogeo en la década del 60 pero posteriormente fue dejada de lado a causa de los inconvenientes que presenta tales como la patogenicidad residual, la modificación del virus en portadores sanos, etc.

c) Otros tipos de vacunas en desarrollo

La actividad de inmunógeno de las partículas de virus de la Fiebre Aftosa se asocia principalmente con una proteína de la cápside, denominada VP_1 (76) (77).

El tratamiento de la partícula viral con tripsina resulta en el clivaje "in situ" de VP_1 que se correlaciona con decrecimiento de infectividad y pérdida de la actividad inmunizante (78) que depende de la cepa viral.

VP_1 es de particular interés porque lleva determinantes antigénicos inductores de anticuerpos neutralizantes (79) (80) mientras que los otros polipéptidos estructurales no. Es probable que la variación antigénica que se observa en el virus de la Fiebre Aftosa sea el resultado de cambios en la estructura de esta proteína. Esta variabilidad ocasiona grandes trastornos en los programas de vacunación y torna al virus no sólo de interés académico sino también para la investigación aplicada.

Se vio que la proteína VP_1 purificada a partir de virus roto

química protege cerdos contra la enfermedad pero induce bajos niveles de anticuerpos neutralizantes, tanto en estos animales como en cobayos (81) (82) (83). Por lo tanto, una vía alternativa para preparar esta vacuna es producir VP_1 a partir de microorganismos manipulados genéticamente (84) (85).

VP_1 puede ser clonada mediante técnicas de ingeniería genética y su posterior expresión antigénicamente activa en E. coli K₁₂ (86) brinda un método para producción de antígenos para vacunas sin el riesgo que trae aparejado la probable presencia de virus inactivado en forma incompleta y fundamentalmente sin que la vacuna resultante sea sensible a la temperatura (87).

La medición de la capacidad inmunogénica de fragmentos de VP_1 tratados química o enzimáticamente mostró que los sitios inductores de anticuerpos neutralizantes se localizan en la mitad cercana al extremo carboxi - terminal de la molécula (88), ello llevó a tratar de obtener por síntesis orgánica péptidos correspondientes a diversas regiones de VP_1 . Algunos de ellos indujeron anticuerpos neutralizantes contra esta enfermedad. El péptido correspondiente a los aminoácidos 141 a 160 (20 aminoácidos) de la proteína VP_1 , contados desde el grupo amino terminal, produjo excelente respuesta de anticuerpos con una sola inoculación (89).

INTRODUCCION ESPECIFICA

Uno de los motivos que llevaron al estudio prolongado e intensivo de los Picornavirus es su incidencia en la salud pública y la sanidad animal. Sin embargo, debe reconocerse que la estructura relativamente simple de los mismos los ha convertido en materia de investigación ideal para la biología molecular.

Poseen la capacidad de innibir rápidamente el metabolismo celular y, una vez avanzada la infección, la maquinaria biosintética del huésped produce prácticamente de modo exclusivo las macromoléculas virales.

Los mecanismos de síntesis proteica empleados por los Picornavirus están establecidos y en la actualidad se acepta que poseen un único sitio de unión a ribosomas (90) (91). Inicialmente se sintetiza una poliproteína cuya existencia fue comprobada en presencia (92) (40) (93) o ausencia de inhibidores proteolíticos (94). Esta es clivada por proteasas celulares dando lugar a una acumulación de polipéptidos que sufren posteriores clivajes por proteasas codificadas por el virus para dar los polipéptidos que normalmente se hallan en las células infectadas (42) (95) (96).

El producto primario derivado de la zona cercana al extremo 5' es el precursor de las proteínas estructurales (P_{88}). Si bien la función primordial de las mismas consiste en la protección de la información genética del virus, se ha demostrado que pueden presentar actividad proteolítica (97) (98).

El proceso morfológico de estos virus puede ser estudiado utilizando precursores radioactivos ya que es posible visualizar la síntesis de las proteínas estructurales virales, así como su ensamblaje debido a que la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares lo permite.

Se ha postulado para los Picornavirus un esquema de morfogénesis en base a trabajos realizados con enterovirus, rinovirus y cardiovirus. Según dicho esquema, se comienza con el ensamblaje del precursor de las proteínas estructurales en pentámeros de coeficiente de sedimentación 13 S y sigue un clivaje proteolítico para dar una estructura que sedimenta en 14 S (99) (100). La unión de doce de estos precursores formarían la procápside (101) (102) (103) (104) (105) (106) (107) que, junto con el RNA viral daría como resultado el provirión (108) (109) (110) (111). Existe finalmente un último clivaje proteico que conduce a la obtención del virión maduro.

Las partículas 14 S, descritas como intermediarios en las etapas tempranas de la morfogénesis de Picornavirus, poseen la capacidad de autoensamblarse para dar procápsides (101) (102) (103) exhibiendo para ello una fuerte dependencia de la concentración inicial de subunidades.

Los extractos citoplasmáticos de células infectadas presentan una actividad que no poseen aquellos preparados a partir de cé-

lulas no infectadas: promueven el ensamblaje de partículas 14 S para dar procápsides "in vitro", bajo condiciones que imposibilitan el autoensamblaje de las mismas (102) (104) (105) (106). Mediante experimentos realizados con partículas defectivas interferentes de poliovirus, se vio que esta actividad depende de la formación del precursor de las proteínas estructurales o de sus productos de clivaje (107).

La morfogénesis de Picornavirus y la replicación viral son procesos que se desarrollan conjuntamente y ambos están asociados a membranas.

La fracción de membranas lisas de células infectadas con poliovirus contiene más del 50% del complejo replicativo viral (112). Se ha postulado que las procápsides están asociadas físicamente con el RNA nativo de dicho complejo y que ésta sería condición necesaria para que se produzca la síntesis continua del RNA viral (111). Asimismo, las partículas maduras de poliovirus recién sintetizado, se hallan asociadas a la fracción de membranas lisas (112).

Para Mengo virus, miembro del género Cardiovirus, se describió una partícula 53 S como intermediario en el proceso de ensamblaje (113) (114). Cuando son purificadas en gradientes de ClCs y se las vuelve a analizar por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, su coeficiente de sedimentación muestra un marcado incremento: 75 S, el esperado para procápsides (115). El mismo efecto

se observó al aumentar la fuerza iónica a 200 mM ClK. Esto puede reflejar un cambio conformacional por el cual una partícula 53 S asimétrica se convierte en una de 75 S más compacta. Se ha reportado una observación similar para células infectadas con enterovirus bovino I (116).

En base a estos resultados, se postuló un esquema de ensamblaje (115) en el cual el RNA interaccionaría con una partícula 75 S o con dos de 53 S para formar un complejo al que luego se unirían dos subunidades 14 S.

En casi todos los Picornavirus se ha descrito la presencia de procápsides (22). También se producen durante la multiplicación del virus de la Fiebre Aftosa, pero su cantidad relativa depende de la cepa viral usada.

Estas procápsides tienen coeficiente de sedimentación 70 S y no contienen RNA genómico (117). Presentan todos los polipéptidos que se hallan en las partículas virales maduras, aunque dos de ellos (VP₂ y VP₄) se encuentran presentes como una única molécula sin clivar (VP₀).

A pesar de que las procápsides han sido bien caracterizadas (118), la función que desempeñan durante la morfogénesis del virus de la Fiebre Aftosa no había sido esclarecida hasta el presente. Estudios previos realizados con poliovirus habían sugerido el hecho de que las procápsides actuaran como precursores virales en el proceso morfogénico (119).

Sin embargo, el rol de las procápsides como precursores virales podría ser discutido teniendo en cuenta que no se detectaron procápsides en encefalomiocarditis (EMC), miembro del género *Cardiovirus* (99), ni en ciertas cepas de poliovirus (120). Además, se han realizado objeciones debido a la dificultad en visualizar la encapsidación de RNA en la estructura "cerrada" de la procápside. Sin duda, resulta más sencillo imaginar el ensamblaje de las subunidades 14 S alrededor del genoma. Por otra parte, no puede excluirse la posibilidad de un equilibrio reversible entre partículas 14 S y procápsides; en este caso estas últimas funcionarían como reservorios de las primeras (22).

Wright y Cooper (121) sugirieron que la relación precursor - producto entre procápsides y viriones podría ser un artefacto metodológico. Se basaron en la heterogeneidad de la fracción que sedimenta entre 60 - 70 S en experimentos de pulso radioactivo y posterior dilución de la marca en presencia de guanidina. Dicha fracción no sólo contenía procápsides sino también ribonucleoproteínas con la misma composición polipeptídica.

En poliovirus (108) (109) (110) y en enterovirus bovino (122) fue descrito un precursor inmediato del virión: el provirión. Está presente en bajas cantidades en la célula infectada (109), su coeficiente de sedimentación es 125 S, es inestable en soluciones de ClCs y por tratamiento con EDTA libera el ácido nucleico y procápsides aparentemente intactas. Su resistencia al tratamiento

con RNAsa sugiere la localización interna del RNA genómico. Es desnaturalizado por SDS al igual que las procápsides, en condiciones tales que los viriones no se afectan.

La formación del provirión na sido reportada en extractos libres de células preparados a partir de células HeLa infectadas con poliovirus (109).

Más adelante, el mismo grupo de investigación comunicó el hallazgo de una partícula de coeficiente de sedimentación 150 S que exhibía las mismas propiedades del provirión y podría representar una forma alternativa del mismo (110). De la misma manera que los viriones, el precursor 150 S se adsorbe y eluye de las células, después de lo cual, su coeficiente de sedimentación es 125 S.

Otro tipo de provirión, llamado provirión II, fue descrito en un enterovirus bovino. Se trata de una partícula que, al igual que el provirión en poliovirus, contiene RNA, pero difiere de éste en su composición polipeptídica (122).

OBJETIVOS Y DESARROLLO

El objetivo de este trabajo de investigación es la determinación de la secuencia morfogénica que conduce al ensamblaje del virus de la Fiebre Aftosa.

En la primera parte de la tesis se describe la determinación de las condiciones adecuadas de experimentación. A continuación se presenta el aislamiento y caracterización fisicoquímica de un intermediario proteico de coeficiente de sedimentación 10 S; éste precedería a las procápsides en el proceso morfogénico de Aftovirus.

En la segunda parte del trabajo se detallan estudios sobre el rol de las procápsides como precursores morfogénicos virales.

Los resultados obtenidos en experimentos de marcación con pulso radioactivo seguido de dilución con exceso de precursor no marcado, mediante inhibidores de proteasas o por bloqueo de la síntesis de proteínas con ciclohexitida permiten establecer que las procápsides son precursores de los viriones en la morfogénesis del virus de la Fiebre Aftosa.

Se postula la existencia de un "pool" de precursores estructurales en el proceso de ensamblaje y se concluye que estaría constituido por monómeros de composición proteica (VP_0 , VP_1 , VP_3).

Finalmente se presenta la secuencia de ensamblaje postulada para Aftovirus en base a los datos obtenidos.

PARTE I

ETAPAS TEMPRANAS

DE LA MORFOGENESIS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

MATERIALES Y METODOS

Células y medios

Las células BHK₂₁ clon 13 fueron obtenidas del Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO). Se las propagó en monocapa en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) (123) suplementado con 10% de suero bovino y 10% de caldo triptosa fosfato.

Las células BHK₂₁ clon 13S, adaptadas al cultivo en suspensión fueron una donación de Laboratorios Pfizer y se cultivaron en medio Eagle modificado para ese fin (124) (125).

El subcultivo terciario de riñón fetal bovino (RFB) fue realizado en nuestro laboratorio a partir del cultivo primario obtenido en la sección Cultivo de Tejidos del Departamento de Virología del C.I.C.V. - I.N.T.A. Castelar. Se utilizó MEM suplementado con 10% de suero bovino y 10% de caldo triptosa fosfato.

En caso necesario, el MEM fue reemplazado por MEM libre de leucina, MEM libre de metionina, MEM suplementado con leucina en concentración 250 veces superior a la normal (250 X) o MEM metionina 250 X.

Cepa viral

En todos los experimentos se empleó virus aftoso A₂₄ Cruzeiro previamente clonado en cultivos de células BHK₂₁ clon 13 y pasado cuarenta veces en la misma línea celular.

El stock viral fue preparado en células BHK₂₁ cultivadas en

frascos rotantes a 37°C. El virus obtenido fue clarificado, concentrado por ultracentrifugación y resuspendido en MEM en una concentración 1:20 respecto de la original. El stock fue conservado a -70°C.

Buffers y soluciones

<u>Buffer RSB</u>		<u>Buffer RSB Mg⁺⁺</u>	
Tris - ClH pH 7,35	0,1 M	Tris - ClH pH 7,35	0,1 M
ClNa	0,1 M	ClNa	0,1 M
		ClMg	1,5 mM

Solución centelleadora

PFO	0,8%
POPOP	0,008%
Tolueno	

Soluciones para electroforesis en geles de poliacrilamida

<u>Solución fijadora</u>		<u>Solución colorante</u>	
ácido tricloroacético	10%	ácido acético	7%
isopropanol	25%	isopropanol	25%
		Coomasie blue	0,05%

Solución decolorante

ácido acético	7%
isopropanol	10%

Buffer de disolución

Tris - ClH pH 6,8	0,48 M
SDS	6%
glicerol	30%
β - mercaptoetanol	5%
azul de bromofenol	0,5%
urea	0,5 M

Soluciones para revelado de radioautografíasRevelador: PQ 6Detenedor: solución de ácido acético 3%Fijador; fijador ácido IF 2

Se emplearon placas fotográficas Kodak X - Omat AR

Procesamiento del material de vidrio y teflon

Todo el material susceptible de estar en contacto con las preparaciones de intermediarios morfogenéticos de bajo coeficiente de sedimentación fue cuidadosamente siliconado.

Infección y procedimientos de marcación radioactiva

Las células BHK₂₁ clon 13S fueron sedimentadas por centrifugación a baja velocidad, lavadas y resuspendidas en MEM en una concentración de 2×10^7 células/ml.

La infección se llevó a cabo a una multiplicidad de 100 a 37°C. La adsorción y penetración de virus duró 40 minutos. La suspensión fue entonces diluida al medio con MEM, se agregaron 5 µg/ml de actinomicina D y se empleó como buffer HEPES (N - 2 hidroximetil piperazina N' - 2 ácido etansulfónico) 0,025 M concentración final.

El precursor radioactivo usado para la marcación de ácido nucleico fue ¹⁴C - uridina (0,5 µCi/ml, New England Nuclear Co. actividad específica 53,2 mCi/mmol) la cual fue agregada 80 minutos p.i. La síntesis de RNA viral fue determinada analizando la incorporación del precursor radioactivo en el RNA a partir de muestras tomadas a diferentes tiempos a lo largo del ciclo de infección. Las cinéticas de síntesis de RNA viral fueron establecidas como un contralor de infección en todos los experimentos descritos.

En aquellas experiencias en que se marcaron las proteínas virales, la infección se llevó a cabo de la misma manera pero el MEM fue reemplazado por MEM libre de leucina o MEM libre de metionina. Cuando se realizó marcación radioactiva con ³⁵S - metionina, las células antes de ser infectadas fueron incubadas con MEM libre de metionina durante 120 minutos.

Las condiciones específicas de cada caso se mencionan en las leyendas de las figuras.

Precisión en el momento de agregado de ^3H - leucina

Cuando la marcación fue realizada al comienzo de la fase exponencial de la multiplicación viral, al efectuar el análisis de los extractos citoplasmáticos por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, toda la radioactividad se concentró en la zona liviana del gradiente. Se obtuvieron perfiles en los que resultó imposible detectar cualquier pico correspondiente a un eventual intermedio que se hallare en baja concentración. El motivo es que en esa región también se marcan profusamente proteínas virales no estructurales.

Se llevaron a cabo experiencias con el fin de ver cuál era el momento óptimo de marcación y se determinó que era cuando la síntesis de ácido ribonucleico viral alcanzaba un 80% del total, como puede apreciarse en la Figura 1.

La marcación posterior fue ineficaz; seguramente el estado avanzado de la multiplicación viral, así como el deterioro celular contribuyeron para ello. Fue sumamente escasa la entrada del precursor tritiado a la célula y muchas de ellas ya habían sufrido lisis.

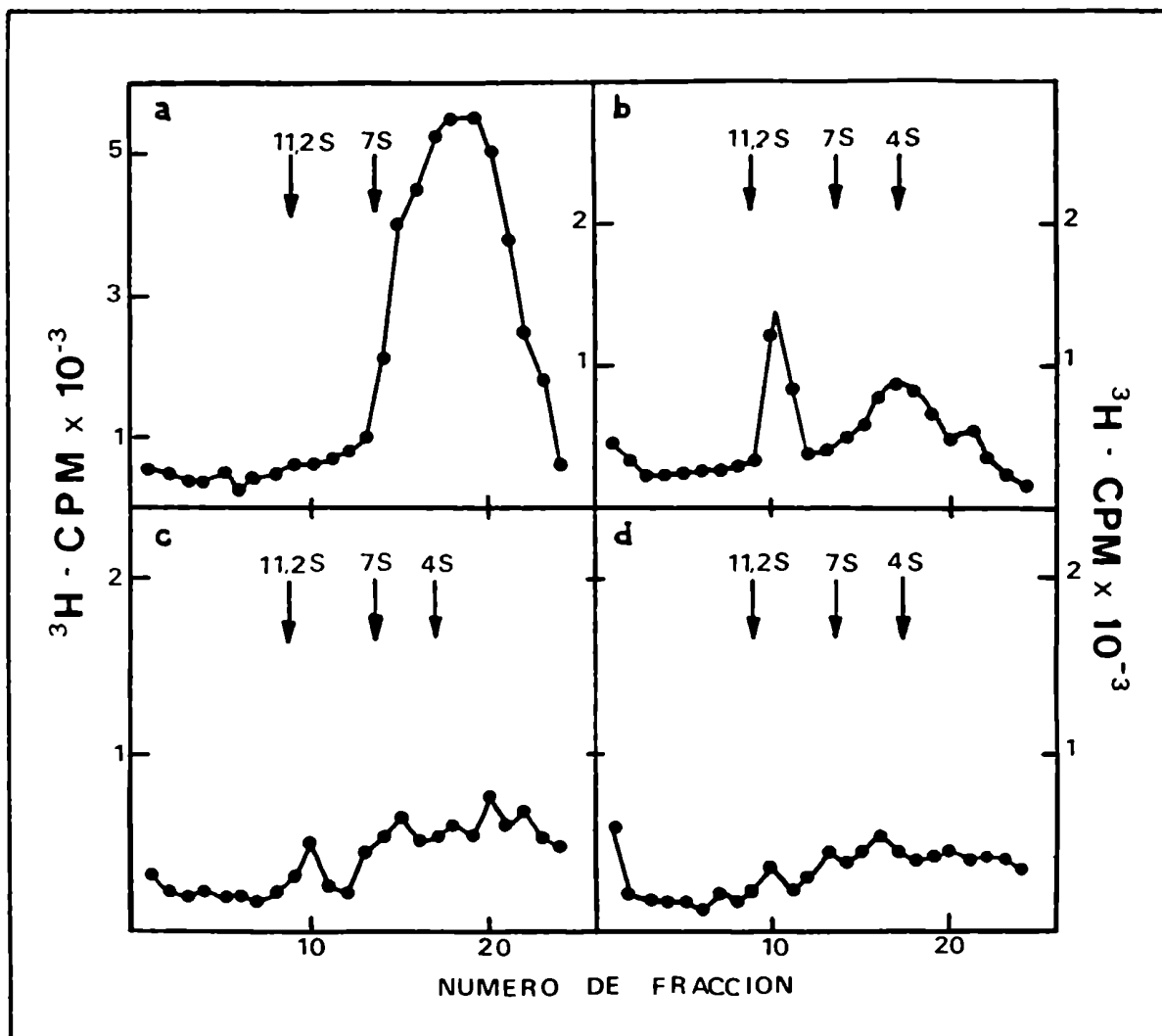


Figura 1

FIGURA 1Determinación del momento óptimo para la realización del pulso
radioactivo

4×10^7 células BHK₂₁ clon 13S infectadas e incubadas con 5 µg/ml de actinomicina D fueron marcadas radioactivamente a los 185 (a), 200 (b), 215 (c) y 230 (d) minutos p.i. mediante un pulso de ³H - leucina (50 µCi/ml) de 5 minutos de duración. A continuación se agregó MEM leucina 250 X y se incubó por espacio de 30 minutos.

Los extractos citoplasmáticos se prepararon como se indica en la sección "Procesamiento de muestras" de Materiales y Métodos.

Se sembraron en sendos gradientes de sacarosa 5 - 20% p/vol en buffer RSB Mg⁺⁺ suplementado con 0,01% de albúmina ovina. La centrifugación se llevó a cabo a 284.000 x g durante 17 horas a 2°C en rotor Beckman SW₄₀.

Las flechas indican la posición de los marcadores catalasa (11,2 S) y tRNA de levadura (4 S).

Duración del pulso de ^3H - leucina

Se ensayaron pulsos de 30, 15, 6, 5 y 4 minutos con el objeto de determinar la duración óptima del período.

Se observó que el "background" de los perfiles de los gradientes de sacarosa disminuyó a medida que se acortó el tiempo del pulso de ^3H - leucina. Este hecho facilita la visualización del pico de un eventual intermediario una vez que se produce la dilución con exceso de leucina no radioactiva y las especies livianas son procesadas.

No se apreciaron diferencias entre los resultados obtenidos con 4 ó 5 minutos de pulso.

Para todas las experiencias descritas en esta primera parte, la duración del pulso radioactivo fue de 5 minutos. También se utilizó este período de marcación cuando el pulso radioactivo se efectuó con ^{35}S - metionina.

Procesamiento de muestras

Los procedimientos usualmente empleados para la preparación de extractos citoplasmáticos en experimentos semejantes realizados con otros virus de la misma familia fueron ineficaces para producir la elución de los intermediarios adheridos a las membranas celulares en el caso del virus de la Fiebre Aftosa.

Por este motivo, se llevaron a cabo experiencias con el objeto

de determinar las mejores condiciones para la preparación de los extractos citoplasmáticos que permitieran no sólo la detección sino también una eficaz recuperación de los precursores proteicos. Para ello se emplearon medios mecánicos, agentes tensioactivos, agentes reductores, sales de potasio, etc.

Este es un punto sumamente importante pues era preciso contar con suficiente material de partida para realizar estudios posteriores.

Entre los procedimientos que se testearon pueden citarse:

- * Uso de homogeneizador
- * Uso de detergentes: (DOC - Brij₅₈) 1%, 0,5%
 NP₄₀ 1%, 0,8%, 0,5%, 0,3%
 Tritón - X 100 1%, 0,05%
- * Uso de agentes reductores: β - mercaptoetanol 0,1%
- * Uso de sales de K⁺: ClK 150 a 700 mM

En cuanto a la preparación de gradientes, se probó incrementar la recuperación de radioactividad en precursores empleando distintas sustancias en las soluciones buffer de corrida:

- * Albúmina bovina 0,1%, 0,01%
- * ClK 10 mM
- * β - mercaptoetanol 0,1%
- * NP₄₀ 0,01%

A partir de la evaluación de todos los resultados obtenidos,

se concluyó que el procedimiento más adecuado era el siguiente:

Las alícuotas fueron centrifugadas a 800 x g y las células se resuspendieron en RSB Mg^{++} a 0°C.

Se agregó Tritón X 100 hasta concentración final 0,05%. A continuación se centrifugó a 1.200 x g para eliminar núcleos y membranas. Se incorporó ClK hasta concentración final 100 mM.

Finalmente se clarificó a 40.000 x g durante 15 minutos y se agregó DOC - Brij₅₈ hasta concentración final 0,5%.

La ultracentrifugación se realizó en gradientes de sacarosa 5 - 20% p/vol en buffer RSB Mg^{++} suplementado con 0,01% de albúmina bovina. Se emplearon tubos Beckman SW₄₀ y las condiciones de corrida fueron 284.000 x g a 2°C durante 19 horas.

Cuantificación de la radioactividad

Los extractos citoplasmáticos fueron analizados por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. La radioactividad fue determinada como material ácido - precipitable agregando un volumen de ácido tricloroacético (TCA) 25% frío a cada fracción y filtrando a continuación a través de membranas Millipore (tamaño de poro: 0,45 μ m). Los filtros fueron secados a 60°C durante 30 minutos y posteriormente se trataron con 5 ml de solución centelleadora. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido Packard 3330.

Se determinaron los perfiles de radioactividad TCA - precipita-

ble para el volumen total de cada fracción colectada cuando se trataba de experimentos con ^3H - leucina y para una alícuota de las mismas si la marcación era con ^{35}S - metionina. En este caso, la fracción restante fue analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida con el fin de establecer las consiguientes correlaciones.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas a ser analizadas fueron precipitadas con TCA 20% concentración final en presencia de albúmina bovina 0,01% como "carrier".

Se mantuvieron a 0°C durante 30 minutos y se centrifugaron a 40.000 x g por espacio de 15 minutos. El precipitado se lavó cuidadosamente con acetona fría y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Una vez retirado el solvente, los restos del mismo fueron evaporados bajo vacío.

Se resuspendió en buffer de disolución y se desnaturalizó a baño maría durante 5 minutos.

Para realizar la electroforesis en geles planos de poliacrilamida, se empleó la metodología descrita por Laemmli (126), con algunas modificaciones en las soluciones que se han aclarado en "Buffers y soluciones".

La fijación se realizó durante 14 horas, la coloración del gel demoró 60 minutos y la decoloración se hizo en aproximadamente 24 horas con agitación mecánica y 6 a 8 cambios de solución decolorante.

Fluorografía

La fluorografía se realizó según adaptación del procedimiento original de Bonner y Laskey (127).

El gel se deshidrató con 20 volúmenes de dimetilsulfóxido (DMSO) durante 30 minutos. Se repitió la operación con 20 nuevos volúmenes de DMSO.

Se sumergió el gel en 4 volúmenes de solución 20% p/p de 2,5 - difeniloxazol (PFO) en DMSO por espacio de 180 minutos.

Para finalizar, se lo hidrató hasta volumen original por un lapso no inferior a 12 horas y se procedió a su secado bajo vacío y con placa calefactora.

Una vez terminada la operación, se colocó el film para radioautografía y se aceleró el proceso situando el gel en contacto con la película a -76°C .(128).

Comprobación de la eficiencia metodológica

Hemos comprobado que las subunidades de coeficiente de sedimentación 12 S en que puede disociarse la cápside proteica viral son altamente hidrofóbicas. Esta característica ocasiona pérdidas importantes durante su purificación debido a la adherencia a todo el material empleado para su procesamiento.

La composición proteica de estas subunidades es VP_1 , VP_2 , VP_3 y la constitución esperada para precursores de procápsides es VP_0 , VP_1 , VP_3 (VP_0 es precursor de VP_2 y VP_4 , los que se obtienen

por clivaje del primero). Aunque no existe una total identidad, las semejanzas permiten estimar que la probabilidad de que se trate de una partícula hidrofóbica es elevada.

Por lo tanto, se corroboró la eficiencia de la metodología a emplearse para la detección y análisis del precursor de procápsides con el fin de descartar esta posible fuente de errores. Para ello se sembró un gradiente de sacarosa con virus marcado radioactivamente con ^3H - leucina y disociado a bajo pH en subunidades 12 S.

La presencia de albúmina bovina en concentración 0,01% en el buffer utilizado ejerció protección sobre la estructura proteica de las subunidades. Cabe consignar que, según ya se especificó en "Procesamiento del material de vidrio y teflon", todo el material fue tratado con siliconas y el manipulo se redujo a lo estrictamente necesario.

En la Figura 2 puede verse que la radioactividad sembrada en el gradiente fue recuperada en dos picos de coeficientes de sedimentación 12 y 5 S. La estructura que sedimenta en 12 S corresponde al pentámero $(\text{VP}_1, \text{VP}_2, \text{VP}_3)_5$ mientras que la de coeficiente de sedimentación 5 S es el monómero $(\text{VP}_1, \text{VP}_2, \text{VP}_3)$.

Esta es la primera vez que se describe este monómero como producto de disociación por acidez de un Picornavirus. Es muy probable que no se lo haya detectado con anterioridad debido a pérdida del mismo por hidrofobicidad lo que comprueba la buena recuperación obtenida con esta metodología.

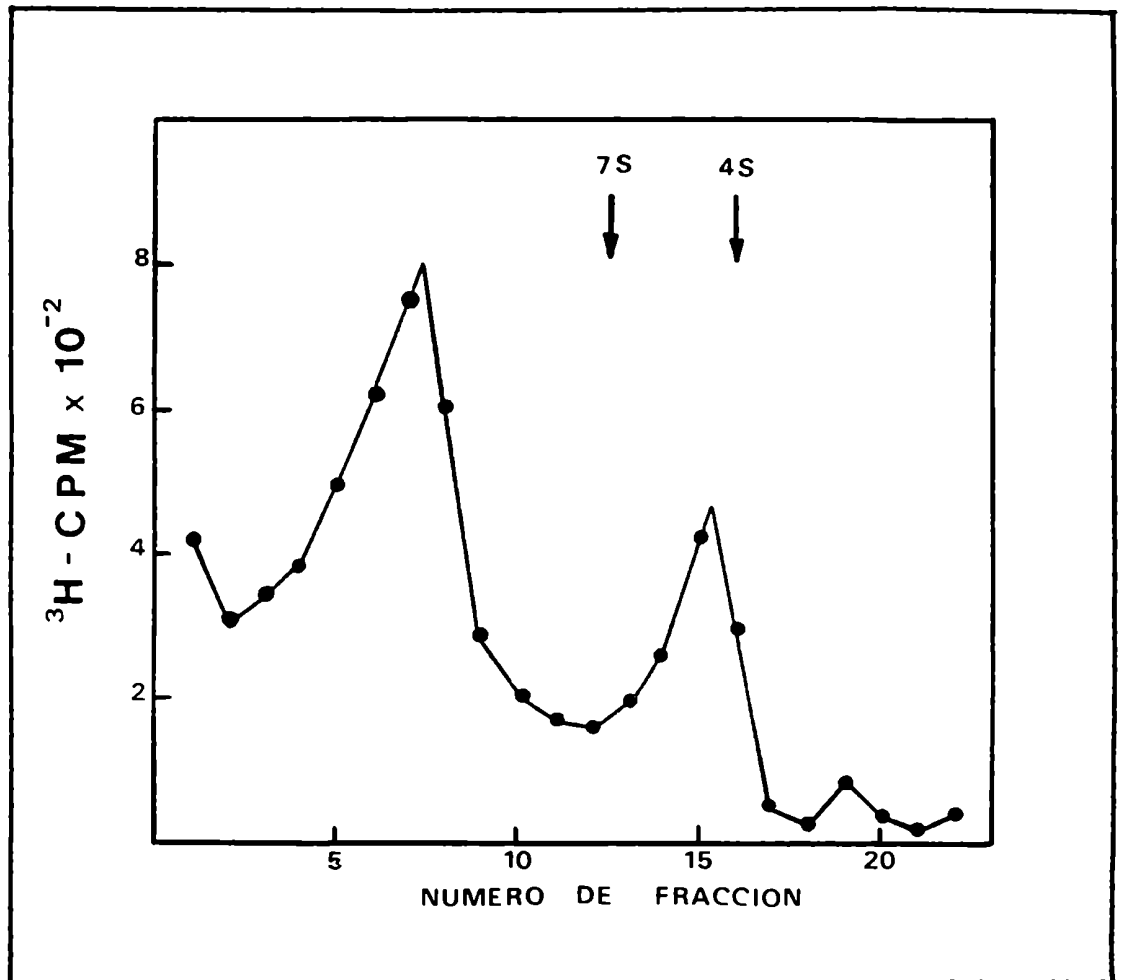


Figura 2

FIGURA 2

Análisis por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de
las subunidades virales obtenidas por tratamiento de viriones
a bajo pH

4×10^7 células BHK₂₁ clon 13 S fueron marcadas a los 185 minutos p.i. con ³H - leucina (10 µCi/ml) en presencia de 5 µg/ml de actinomicina D.

Al detectarse efecto citopático total, se preparó el extracto citoplasmático resuspendiendo las células en RSB Mg⁺⁺, se llevó a 0,01% con Tritón X 100 y se centrifugó para retirar los núcleos.

Se agregó ClK hasta concentración final 10 mM y una vez que el extracto citoplasmático fue unido a su correspondiente sobrenadante se clarificó a 10.000 x g durante 15 minutos.

El virus fue sedimentado por centrifugación a 284.000 x g durante 60 minutos en rotor Beckman SW₄₀ a 2°C. Se lo resuspendió en buffer RSB Mg⁺⁺ y se ajustó el pH a 4,9; en estas condiciones se lo incubó 30 minutos a temperatura ambiente.

Al cabo de ese tiempo, el pH fue restituido a 7,35 y se sembró un gradiente de sacarosa 5 - 30% p/vol en RSB Mg⁺⁺ suplementado con 0,01% albúmina bovina. Se centrifugó 15,5 horas a 284.000 x g a 2°C.

Las flechas indican la posición de los marcadores IgG (7 S) y tRNA de levadura (4 S).

Drogas y radioisótopos

Todas las drogas empleadas fueron de Sigma Chemical Company y los radioisótopos de New England Nuclear Corporation.

RESULTADOS

Detección de un intermediario morfogénico de bajo coeficiente de sedimentación

A los 200 minutos p.i., fueron marcadas radioactivamente células BHK₂₁ clon 13S infectadas, mediante un pulso de ³H - leucina de 5 minutos de duración. A continuación se agregó exceso de leucina no radioactiva y se incubó durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo, se preparó el correspondiente extracto citoplasmático según lo especificado en Materiales y Métodos.

En la Figura 3 se muestra el perfil obtenido por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Puede apreciarse un pico de coeficiente de sedimentación 10 S y una zona algo heterogénea en 4,5 - 5 S.

Este resultado fue reproducible y la cantidad de radioactividad recuperada en las partículas 10 S siempre resultó escasa, mientras que la marcación en la zona 4,5 - 5 S fue fluctuante pudiendo alcanzar valores muy elevados. El "background" presente en todos los casos en forma constante a lo largo del gradiente no pudo ser eliminado.

Se efectuó un estudio con cultivo terciario de células de riñón fetal bovino (RFB) con el objeto de extender a otro sistema celular las observaciones realizadas con células BHK₂₁ infectadas. Mediante experimentos similares a los realizados con células BHK₂₁ se confirmó la presencia de una estructura que sedimenta en 10 S así como una zona heterogénea hacia la región liviana del

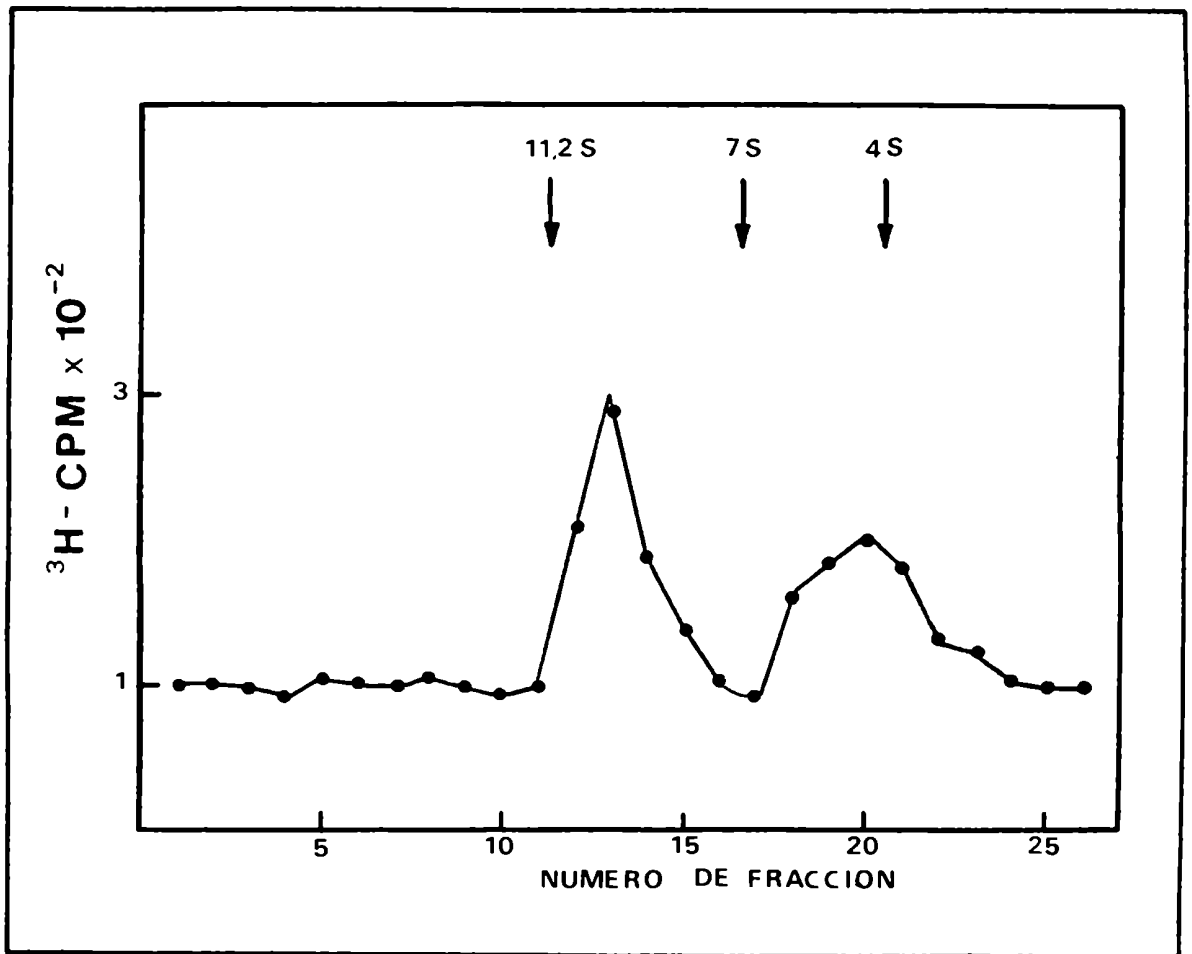


Figura 3

FIGURA 3

Detección de un intermediario morfogenético de bajo coeficiente
de sedimentación por ultracentrifugación en gradientes de saca-
rosa de extractos citoplasmáticos de células infectadas

Un total de 5×10^6 células BHK₂₁ clon 13S infectadas e incubadas con 5 µg/ml de actinomicina D fueron marcadas radioactivamente a los 200 minutos p.i. mediante un pulso de ³H - leucina (45 µCi/ml) de 5 minutos de duración. A continuación, se agregó MEM leucina 250 X y se incubó por espacio de 30 minutos.

El extracto citoplasmático se preparó como se especifica en Materiales y Métodos y se sembró un gradiente de sacarosa 5 - 20% p/vol en buffer RSB Mg⁺⁺ suplementado con 0,01% de albúmina bovina.

La centrifugación fue a 284.000 x g durante 16 horas a 2°C en rotor Beckman SW₄₀.

Las flechas indican la posición de los marcadores catalasa (11,2 S), IgG (7 S) y tRNA de levadura (4 S).

gradiente de sacarosa (Figura 4).

En conjunto, estos resultados permiten postular la existencia de un intermediario morfogenético de coeficiente de sedimentación 10 S que tendría el rol de precursor de las procápsides en el proceso de ensamblaje del virus de la Fiebre Aftosa.

Caracterización fisicoquímica del intermediario de coeficiente de sedimentación 10 S

Se infectaron células BHK₂₁ y se hizo un pulso de ³H - leucina seguido de dilución con exceso del aminoácido no radioactivo.

El extracto citoplasmático, preparado del modo habitual, fue dividido en cuatro fracciones. Una de ellas se trató con CLK 700 mM, otra se llevó a 0,1% concentración final con β-mercaptoetanol, la tercera se hizo 10 mM en EDTA (el buffer del correspondiente gradiente careció de Mg⁺⁺) y la última fracción sirvió como control.

Se sembraron sendos gradientes de sacarosa y de los perfiles obtenidos (Figura 5) pudieron sacarse las siguientes conclusiones acerca del intermediario de coeficiente de sedimentación 10 S:

- * requiere Mg⁺⁺ para su estabilidad
- * no se afecta por elevada fuerza iónica
- * es muy sensible a agentes reductores

Asimismo, ya habíamos establecido que es purificable en presencia de detergentes aniónicos bajo la protección de albúmina bo-

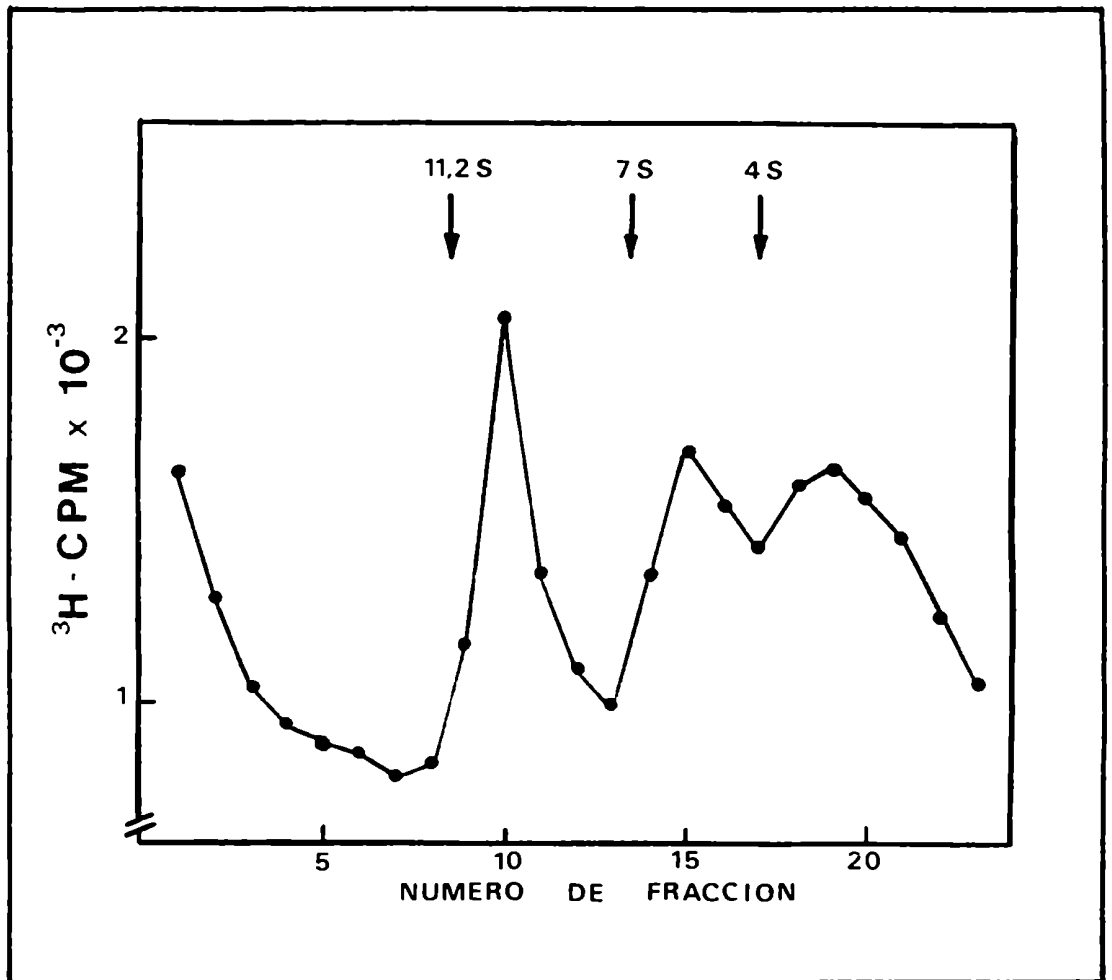


Figura 4

FIGURA 4

Detección de un intermediario morfogenético de coeficiente de sedimentación 10 S por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de extractos citoplasmáticos de células RFB infectadas

3×10^6 células de cultivo terciario de RFB infectadas fueron marcadas radioactivamente mediante un pulso de ^3H - leucina (80 $\mu\text{Ci/ml}$) a los 205 minutos p.i. en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D.

Se incubó con exceso de leucina no radioactiva durante 30 minutos al cabo de los cuales se retiró dicho medio, se agregó RSB Mg^{++} (0°C) y se procedió a desprender la monocapa mediante tres ciclos sucesivos de congelamiento y descongelamiento. A partir de este momento se prosiguió con el agregado de Tritón X 100 tal como se describe en Materiales y Métodos.

Se sembró un gradiente de sacarosa 5 - 20% p/vol en RSB Mg^{++} suplementado con 0,01% de albúmina bovina. Se centrifugó a 284.000 x g durante 17 horas a 2°C en rotor Beckman SW₄₀.

Las flechas indican la posición de los marcadores catalasa (11,2 S), IgG (7 S) y tRNA de levadura (4 S).

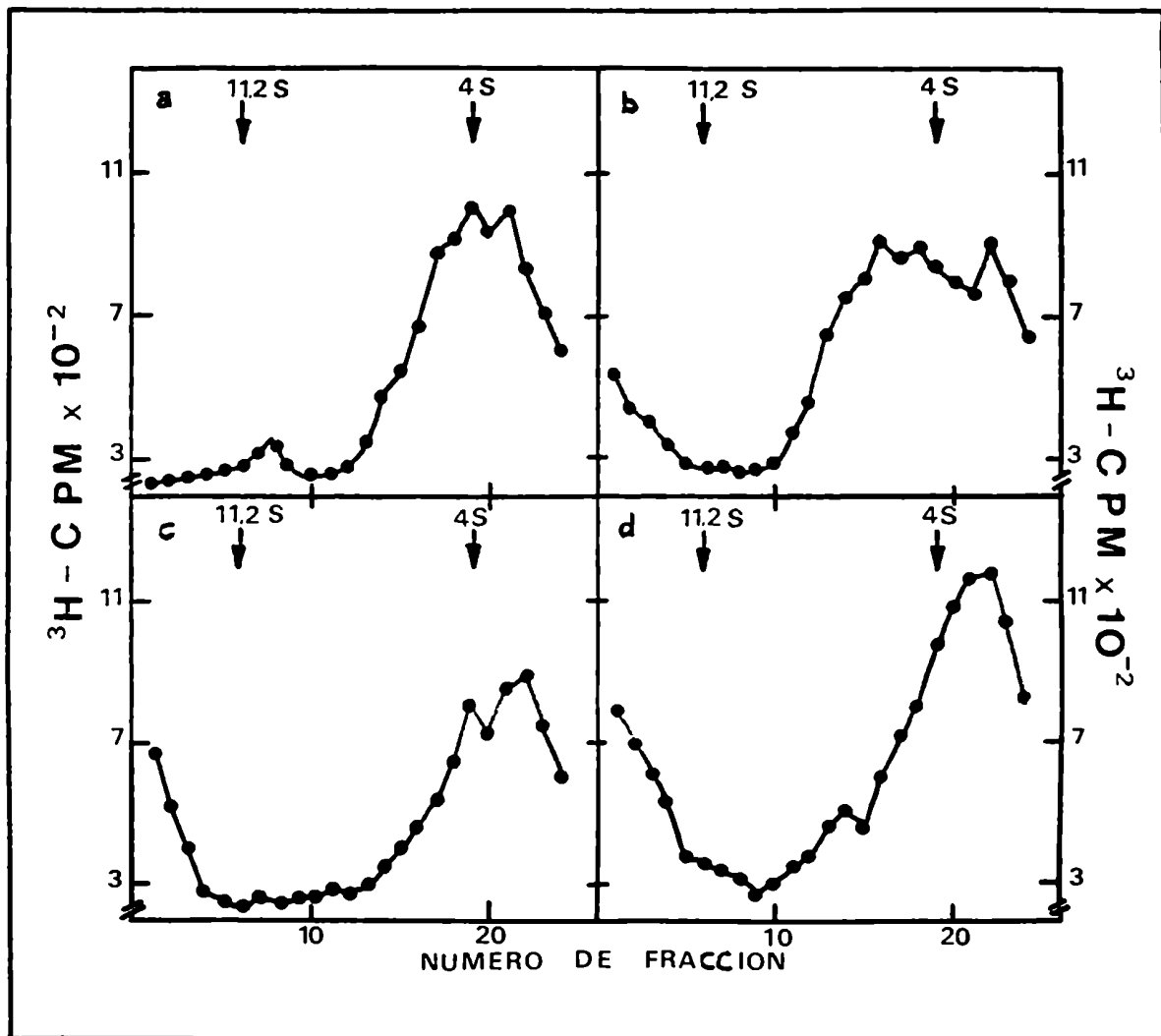


Figura 5

FIGURA 5Caracterización del intermediario morfogénico de coeficientede sedimentación 10 S

4×10^7 células BHK₂₁ clon 13S infectadas fueron marcadas con un pulso de ³H - leucina (75 μ Ci/ml) de 5 minutos de duración a los 180 minutos p.i. en presencia de 5 μ g/ml de actinomicina D.

Se practicó dilución de la radioactividad con exceso de precursor no marcado por espacio de 30 minutos, al cabo de los cuales se preparó un extracto citoplasmático centrifugando las células a 800 x g y resuspendiendo en 2 ml de RSB Mg⁺⁺ (0°C), a continuación se agregó Tritón X 100 hasta concentración final 0,05%. Se centrifugó a 1.200 x g y se incorporó CLK hasta concentración final 100 mM.

El extracto fue dividido en cuatro fracciones que fueron tratadas con (DOC - Brij₅₈) 0,5% concentración final (a), CLK 700 mM concentración final (b), β - mercaptoetanol 0,1% concentración final (c) y EDTA 10 mM concentración final (d).

La ultracentrifugación de (a), (b) y (c) se realizó en gradientes 5 - 20% p/vol sacarosa en buffer RSB Mg⁺⁺ y en buffer RSB para el extracto (d). En ambos casos el buffer fue suplementado con 0,01% de albúmina bovina. Las condiciones de corrida fueron 284.000 x g durante 19 horas a 2°C en rotor Beckman SW₄₀.

Las flechas indican la posición de los marcadores catalasa (11,2 S) y tRNA de levadura (4 S).

vina en concentración 0,01%. Por otra parte, en experimentos posteriores se vio que el perfil radioactivo que se obtiene por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa no se modifica por incubación del extracto citoplasmático con 20 µg/ml de RNAsa pancreática.

El coeficiente de sedimentación 10 S corresponde a un intermediario trimérico según los valores establecidos por Rueckert (22) para protómeros oligoméricos (Tabla I).

Este hecho, sumado a las observaciones enunciadas indican que el intermediario detectado sería un trímero constituido por monómeros unidos probablemente por puentes disulfuro.

Análisis electroforético del intermediario morfogenético

Se analizó la presencia de las proteínas estructurales VP₀, VP₁ y VP₃ a lo largo de un gradiente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con el fin de establecer la composición polipeptídica del precursor de coeficiente de sedimentación 10 S y aquella de la región 4,5 - 5 S.

Se llevó a cabo un experimento de pulso radioactivo con ³⁵S - metionina seguido de incubación con gran exceso de este aminoácido no marcado. Se analizó el extracto citoplasmático por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y se estableció el perfil de radioactividad TCA - precipitable del mismo leyendo una alícuota de cada fracción colectada (Figura 6).

TABLA I

Coefficientes de sedimentación de protómeros oligoméricos*

<u>Oligómeros</u>	<u>Masa</u>	S_{20, H_2O}
(VP_0, VP_1, VP_3)	95.000	4,8
$(VP_0, VP_1, VP_3)_2$	190.000	7,7
$(VP_0, VP_1, VP_3)_3$	285.000	10,1 ←
$(VP_0, VP_1, VP_3)_4$	380.000	12,2
$(VP_0, VP_1, VP_3)_5$	475.000	14,2
$(VP_0, VP_1, VP_3)_6$	570.000	16,0

* según R.R. Rueckert (22)

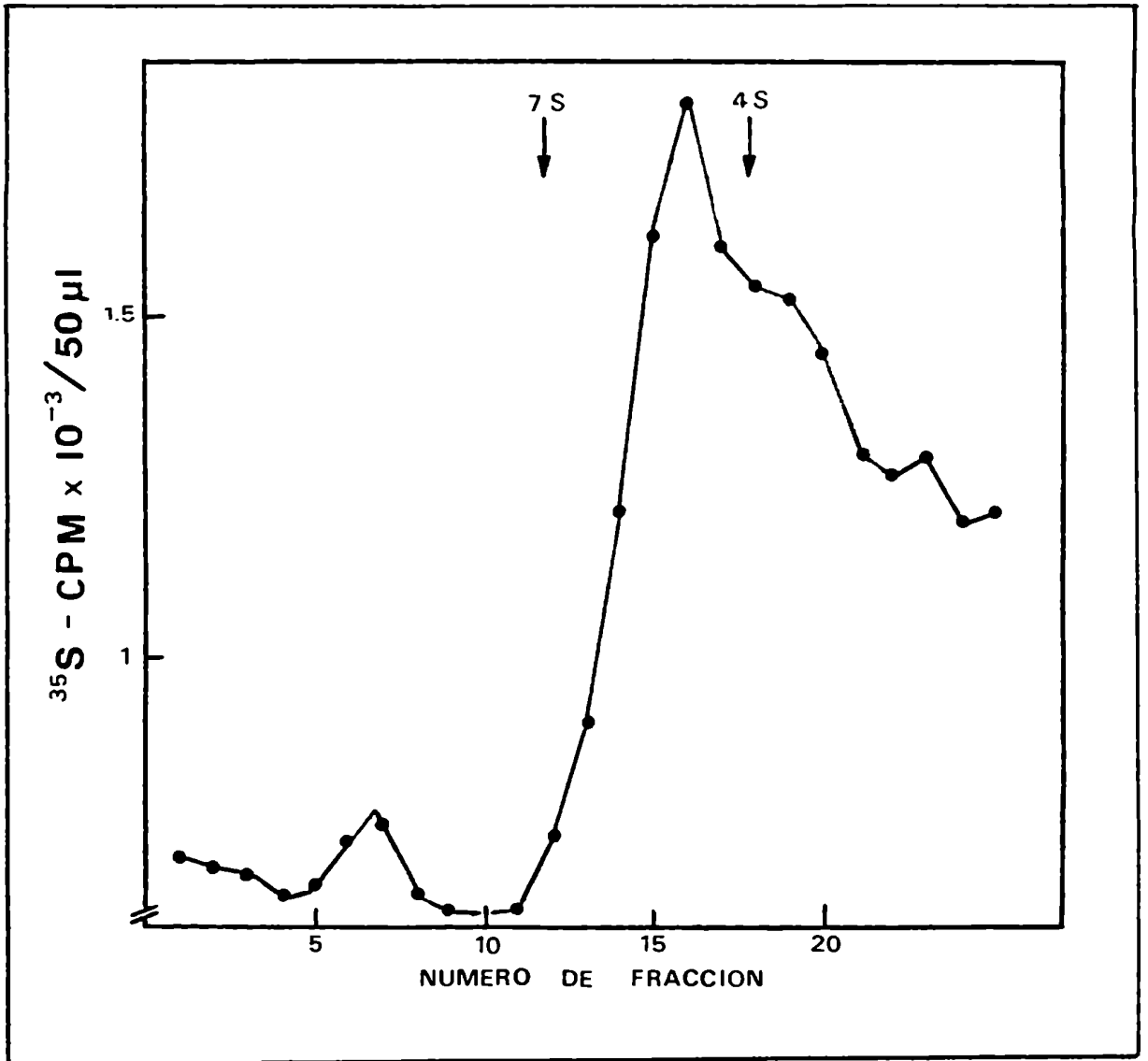


Figura 6

FIGURA 6Sedimentación en gradientes de sacarosa de extractos citoplasmáticos de células infectadas marcados con ^{35}S - metionina

6×10^7 células BHK₂₁ clon 13S previamente ayunadas fueron infectadas y marcadas radioactivamente mediante un pulso de ^{35}S - metionina (200 $\mu\text{Ci/ml}$) de 5 minutos de duración a los 215 minutos p.i. en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D.

La incubación con exceso de metionina no radioactiva duró 30 minutos, al cabo de los cuales, se preparó el correspondiente extracto citoplasmático como se detalla en Materiales y Métodos.

La ultracentrifugación se realizó a 284.000 x g a 2°C durante 19 horas en rotor Beckman SW₄₀. Los gradientes fueron 5 - 20% sacarosa en buffer RSB Mg^{++} suplementado con albúmina bovina en concentración 0,01%.

Se analizó la radioactividad TCA - precipitable en alícuotas de 50 μl de las fracciones colectadas.

Las flechas señalan las posiciones de los marcadores IgG (7 S) y tRNA de levadura (4 S).

Se unieron convenientemente las fracciones y luego de precipitar y desnaturalizar las proteínas de las mismas se sometió a éstas a electroforesis en geles planos de poliacrilamida, según se especificó en Materiales y Métodos.

En la radioautografía de la figura 7 se verifica la presencia de los polipéptidos virales inducidos en células infectadas con el virus de la Fiebre Aftosa. Sin embargo, no es posible establecer diferencias entre las calles en cuanto a las proteínas estructurales VP_0 , VP_1 y VP_3 . El "background" presente en todo el gradiente enmascara la determinación de la composición proteica del intermediario 10 S debido a que el mismo se halla en muy baja concentración.

Las tentativas realizadas para obtener el intermediario en mayor proporción fracasaron en su totalidad porque la vida media del mismo es muy corta y la velocidad de síntesis de procápsides elevada.

El análisis del material sedimentado en el fondo del tubo cuando se centrifugó el gradiente de sacarosa (Figura 7, calle 1) muestra el típico patrón proteico de las procápsides, contaminado por la presencia de la polimerasa viral P_{56_a} y el polipéptido precursor de la misma, P_{72} .

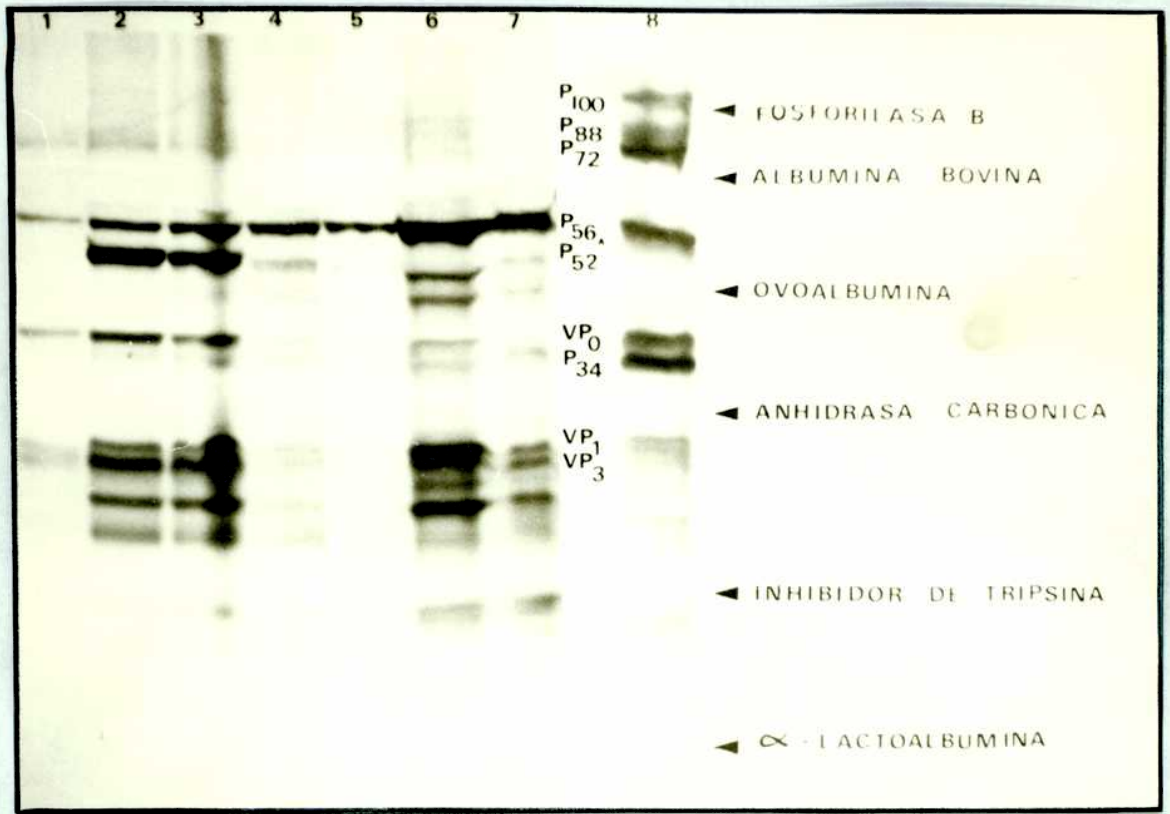


Figura 7

FIGURA 7

Análisis electroforético de las fracciones colectadas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de extractos citoplasmáticos de células infectadas marcados con ^{35}S - metionina

Las fracciones colectadas en el experimento que se describe en la leyenda de la Figura 6, fueron reunidas convenientemente y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, según se especifica en Materiales y Métodos.

Calle 1: material sedimentado en el fondo del tubo de centrífuga

Calle 2: fracciones 1 y 2 del gradiente de la Figura 6

Calle 3: fracciones 3, 4 y 5 del gradiente de la Figura 6

Calle 4: fracciones 6, 7 y 8 del gradiente de la Figura 6

Calle 5: fracciones 9, 10 y 11 del gradiente de la Figura 6

Calle 6: fracciones 12, 13 y 14 del gradiente de la Figura 6

Calle 7: fracciones 15, 16 y 17 del gradiente de la Figura 6

Calle 8: extracto citoplasmático de células infectadas marcado radioactivamente durante 30 minutos con ^{35}S - metionina

Las flechas indican las posiciones de los marcadores de peso molecular: fosforilasa b (94.000); albúmina bovina (67.000); ovoalbúmina (43.000); anhidrasa carbónica (30.000); inhibidor de tripsina (20.000); α - lactoalbúmina (14.400).

PARTE II

ETAPAS TARDIAS

DE LA MORFOGENESIS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

MATERIALES Y METODOS

Células y medios

Se emplearon células BHK₂₁ clon 13S cultivadas en monocapa o suspensión, tal como se describió en la Parte I.

Quando fue necesario, el MEM fue reemplazado por MEM libre de leucina o lisina o bien suplementado con 100 veces la concentración normal de leucina (MEM leucina 100 X).

Cepa viral

Idem Parte I.

Buffers y soluciones

RSB, RSB Mg⁺⁺, solución centelleadora, ver Parte I.

Buffer NET

Tris	0,05 M
EDTA	1 mM
ClNa	0,1 M
pH 7,35	

Procesamiento de muestras

Las muestras tomadas durante el tiempo de marcación y/o durante el período de dilución de la marca fueron inmediatamente colocadas en hielo y centrifugadas a 800 x g por tres minutos. Los

sobrenadantes fueron separados y clarificados.

Los extractos citoplasmáticos fueron preparados resuspendiendo el precipitado celular en 0,5 ml de buffer hipotónico RSB frío; las células se lisaron por adición de Tritón X 100 (0,01%) y la isotonicidad fue restablecida con ClNa. Los núcleos fueron separados por centrifugación a 1000 x g durante 2 minutos.

Los sobrenadantes y los extractos citoplasmáticos fueron unidos para cuantificar los valores totales de procápsides. Se llevaron entonces a 0,01 M EDTA (pH 7,4) y se incubaron con 20 µg/ml de RNAsa pancreática durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras fueron clarificadas por centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos y analizadas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa en buffer NET.

Los gradientes fueron realizados en tubos Beckman SW₂₇ agregando desde el fondo un colchón de 7 ml de un gradiente de sacarosa en buffer NET 60 - 30% p/vol y 29 ml de un gradiente de sacarosa en buffer NET 30 - 10% p/vol.

La centrifugación se llevó a cabo a 136.000 x g durante 7 horas a 3°C. Este tipo de gradientes permitió obtener máxima resolución de las fracciones de interés 140 y 70 S.

Las fracciones fueron colectadas con monitoreo continuo de absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro equipado con celda de flujo continuo.

Se determinaron los perfiles de radioactividad TCA - precipi-

table en forma semejante a la especificada en la Parte I.

La radioactividad se midió en un contador de centelleo Beckman LS 3150 que permitió el conteo radioactivo de ^3H en presencia de ^{14}C .

RESULTADOS

Purificación de virus y procápsides en experimentos de pulso
y posterior dilución de la marca

Una de las principales objeciones acerca del rol de las procápsides en poliovirus determinado por Baltimore (119) fue hecha por Wright y Cooper, quienes encontraron un pico heterogéneo que sedimentaba en 60 - 70 S en células infectadas con poliovirus y tratadas con guanidina. En este pico se detectó la presencia de procápsides, ribonucleoproteínas virales y subunidades ribosomales unidas a polipéptidos virales (121).

Se llevaron a cabo experimentos con células BHK₂₁ clon 13S infectadas con virus de la Fiebre Aftosa para determinar si era posible obtener viriones y procápsides purificados bajo nuestras condiciones experimentales.

Las células infectadas, después de ser incubadas durante 120 minutos a 37°C fueron marcadas con ³H - leucina con un pulso de 30 minutos de duración y luego de centrifugadas fueron resuspendidas en MEM conteniendo un gran exceso de leucina, medio en el que se prolongó la incubación durante 30 minutos adicionales.

Los extractos citoplasmáticos y los sobrenadantes fueron procesados por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. (Figura 8).

En la Figura 8a se muestra un pico de virus de 140 S y un pico

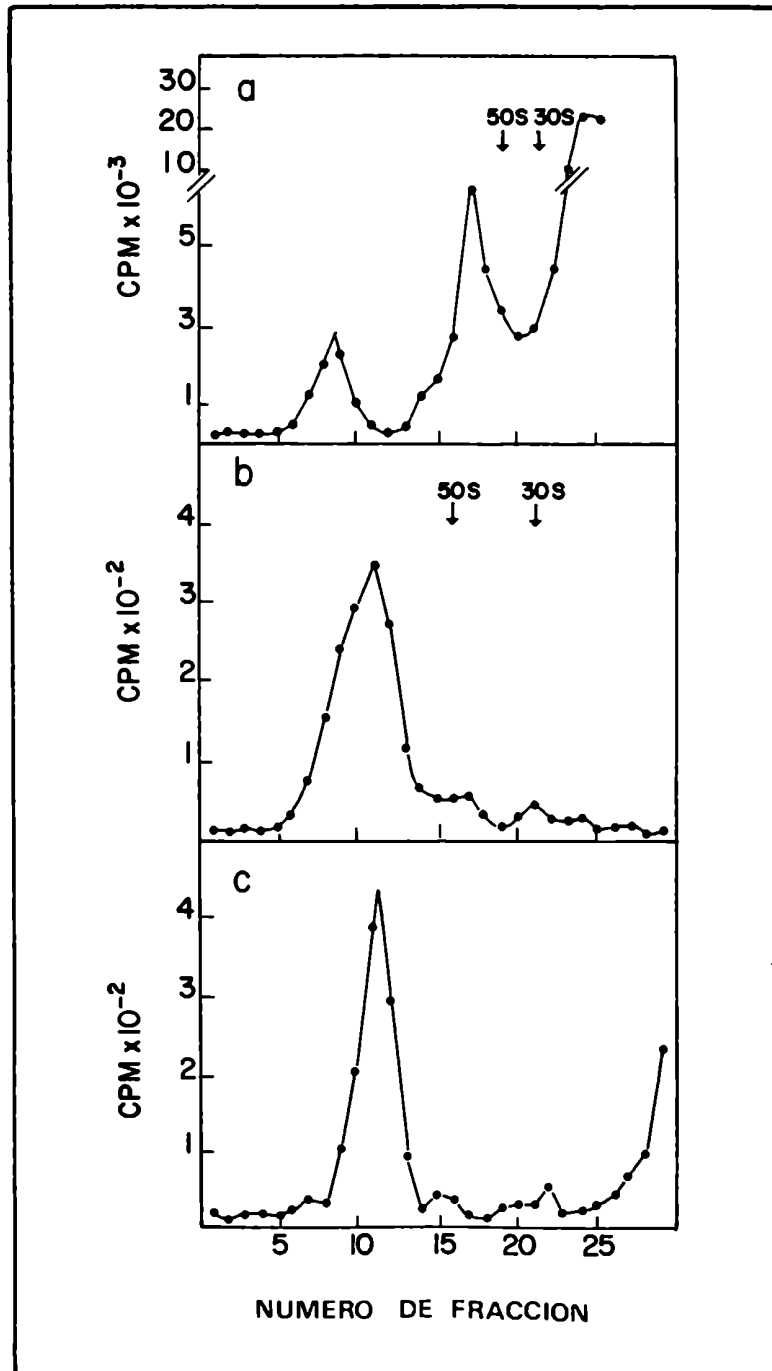


Figura 8

FIGURA 8

Perfil de sedimentación de extractos citoplasmáticos más sobrenadantes de células BHK infectadas con virus de la Fiebre Aftosa

5×10^7 células BHK₂₁ clon 13S infectadas, en presencia de 5 µg/ml de actinomicina D fueron marcadas radioactivamente con un pulso de ³H - leucina (20 µCi/ml) a los 120 minutos p.i. La marcación duró 30 minutos. Luego las células fueron centrifugadas a 800 x g durante 3 minutos y resuspendidas en MEM leucina 100 X e incubadas por espacio de 30 minutos.

El extracto citoplasmático se preparó como se describe en Materiales y Métodos y se sembró junto con el sobrenadante en un gradiente de sacarosa 10 - 30% p/vol en buffer NET.

La centrifugación se llevó a cabo a 126.000 x g durante 4,5 horas a 2°C en un rotor Beckman SW_{27.1}. La radioactividad ácido,- precipitable se midió en alícuotas de las fracciones colectadas (a).

Se juntaron los tubos 15 a 20 y se dividieron en alícuotas idénticas que fueron incubadas sin (b) o con (c) RNAsa - EDTA como se detalla en el texto. A continuación estas alícuotas se sembraron en sendos gradientes de sacarosa 15 - 30% p/vol en buffer NET y se centrifugaron 13 horas a 89.800 x g en rotor Beckman SW₂₇ a 2°C.

Las flechas indican la posición de las subunidades ribosomales ocasionadas por el tratamiento con EDTA, usadas como marcadores.

heterogéneo de 70 S correspondiente por su coeficiente de sedimentación a procápsides. El "pool" de fracciones 15 a 20 de este gradiente fue dividido en dos alícuotas que fueron posteriormente purificadas por centrifugación en un segundo gradiente más resolutivo.

La heterogeneidad del pico que se muestra en la Figura 8b indica la presencia de contaminantes virales cosedimentando con las procápsides. Sin embargo, el tratamiento con RNasa y EDTA de la otra alícuota previamente a la centrifugación de la misma dio un pico homogéneo de 70 S y una disminución de aproximadamente el 90% de la radioactividad (Figura 8c).

En la fracción tratada con RNasa y EDTA se vieron sólo procápsides por microscopía electrónica.

Se obtuvieron resultados similares tratando la mezcla de sobrenadante y extracto citoplasmático con RNasa - EDTA antes de la centrifugación, de ahí que se adoptó este método para el procesamiento de muestras. Los stocks de virus y procápsides purificados no fueron afectados por este tratamiento.

Pasaje de radioactividad de procápsides a viriones en experi-
mentos de pulso y posterior dilución de la marca

Con el objeto de investigar si las procápsides son precursores de los viriones, se infectaron células BHK₂₁ clon 13S y se incubaron por 170 minutos. Se marcaron radioactivamente con un pulso de ³H - leucina durante 6 minutos y la dilución de la marca se hizo agregando un gran exceso de leucina sin marcar.

Las muestras, tomadas a diferentes tiempos después de la dilución de la marca, fueron procesadas y analizadas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, como se describió en Materiales y Métodos.

Los resultados que se muestran en la Figura 9 indican la presencia de dos picos importantes correspondientes a virus y procápsides sintetizados entre 10 y 70 minutos después de la dilución de la marca. En las muestras tempranas, los picos de procápsides contienen más radioactividad que aquellos correspondientes a los viriones. Sin embargo, con incubación prolongada aumenta la relación virus marcado a procápsides marcadas mientras que la radioactividad en procápsides permanece constante.

En la Figura 10 puede observarse una cuantificación de estos datos. Durante los primeros 25 minutos después de la dilución de la marca, la velocidad de síntesis de virus es sólo la mitad de la correspondiente a procápsides. Después de este tiempo, la ve-

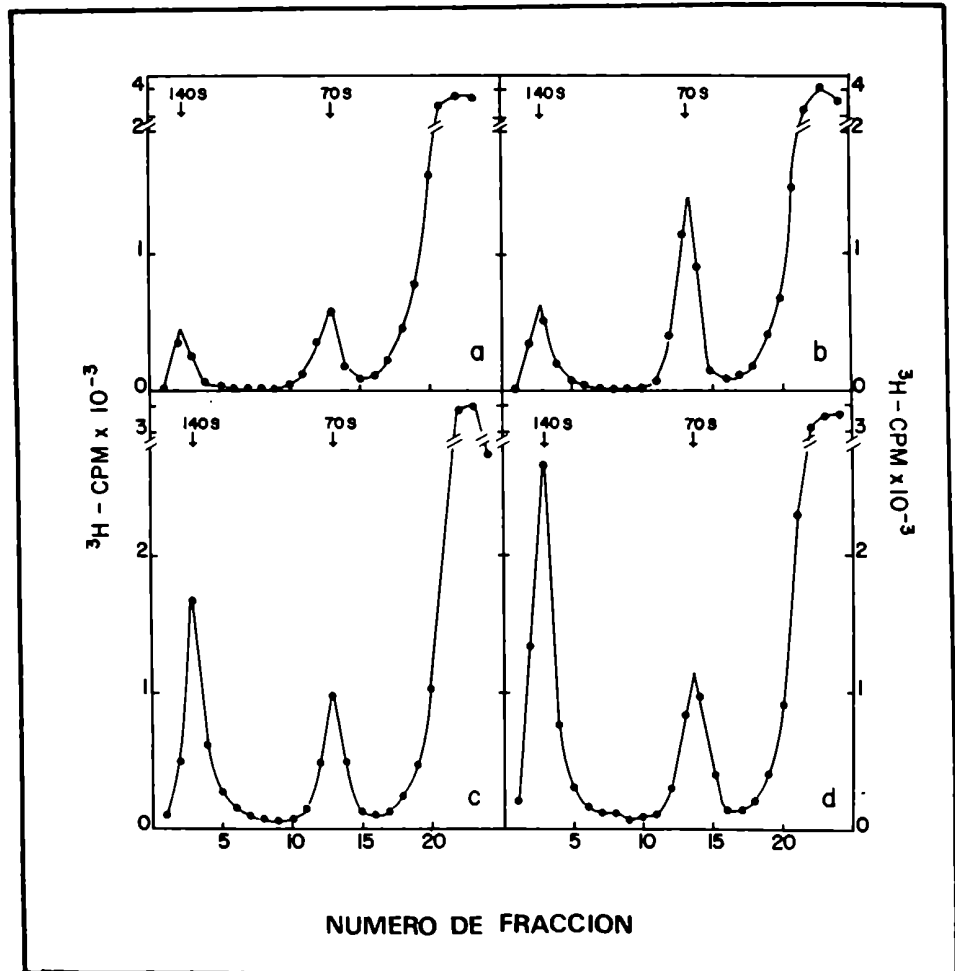


Figura 9

FIGURA 9

Análisis por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de
extractos citoplasmáticos más sobrenadantes de células BHK₂₁
clon 13S infectadas y marcadas con pulso radioactivo

A los 170 minutos p.i., 5×10^7 células fueron marcadas mediante pulso de ^3H - leucina (70 $\mu\text{Ci/ml}$) de 6 minutos de duración. Luego, las células fueron centrifugadas y transferidas a MEM leucina 100 X.

Se tomaron alícuotas idénticas luego de períodos de incubación de 10 (a), 25 (b), 45 (c) y 70 minutos (d).

Los sobrenadantes y extractos citoplasmáticos fueron procesados y analizados por centrifugación en gradientes de sacarosa tal como se describe en el texto.

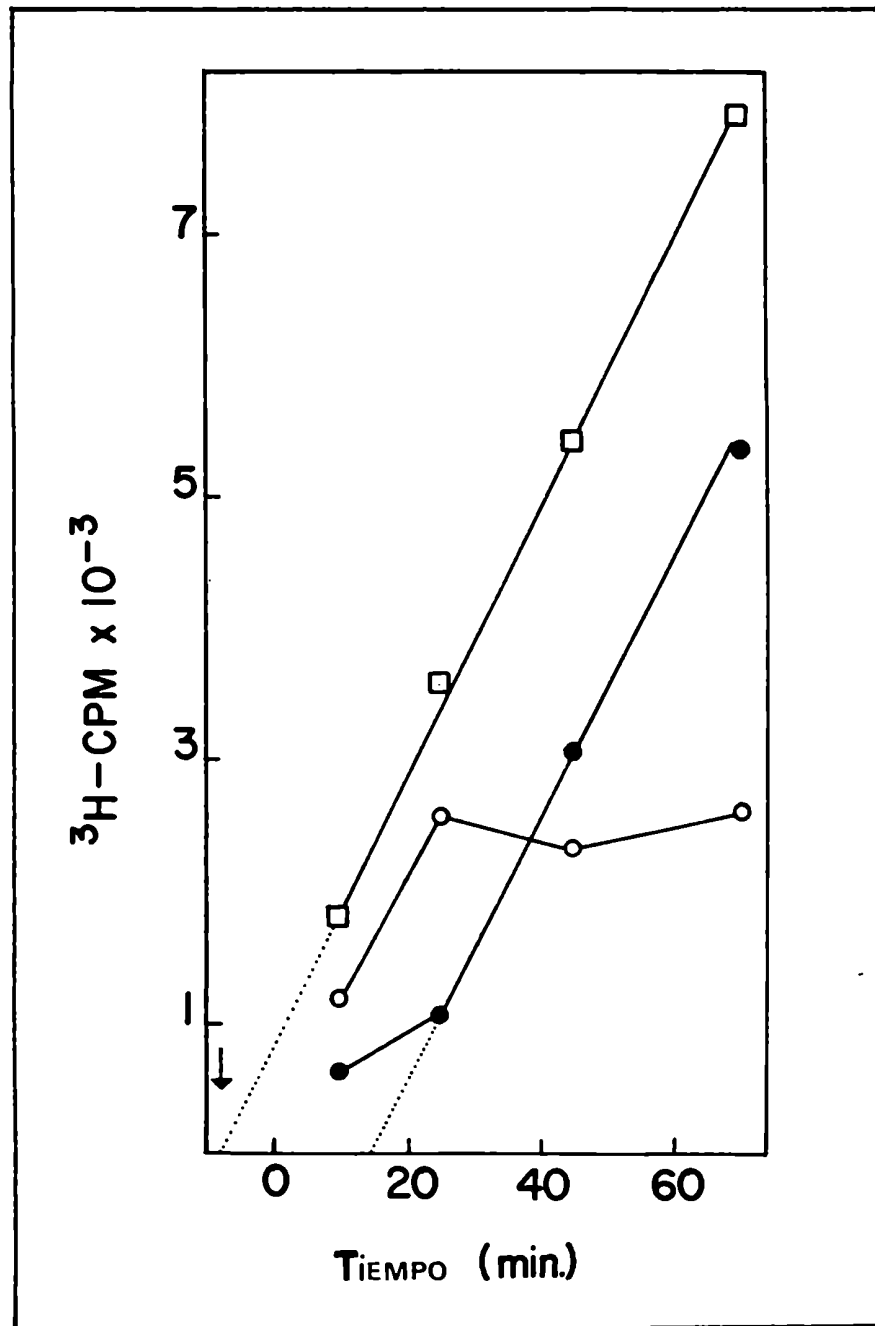


Figura 10

FIGURA 10

Síntesis de procápsides, viriones y partículas totales en experi-
mentos de pulso y dilución de la marca con células BHK₂₁ clon 133

infectadas

La cantidad de radioactividad en procápsides (○) y viriones (●) fue calculada por integración de las respectivas áreas bajo los picos de la Figura 9.

La radioactividad en partículas totales (□) se calculó sumando los valores de procápsides y virus.

La flecha indica el momento de agregado de ³H - leucina.

El tiempo en abcisas se indica a partir del momento en que se efectuó la dilución de la marcación con exceso de aminoácido no radioactivo.

locidad de síntesis viral alcanza su máximo y permanece constante hasta los 70 minutos. También se hace evidente que no hay un incremento en la cantidad de procápsides sintetizadas en este período. Por otra parte, la síntesis de partículas totales (virus más procápsides) permanece constante desde el momento de agregado del precursor radioactivo hasta los 70 minutos luego de la dilución de la marca.

Este resultado podía preverse si las procápsides fueran precursores en la síntesis viral. Entonces, las partículas totales representarían el total de procápsides: las acumuladas y aquellas que constituyen viriones luego de incorporar el RNA.

Los resultados mostrados, especialmente aquellos obtenidos entre 0 y 25 minutos después de la dilución de la marca sugieren que existe una relación precursor - producto entre procápsides y virus.

Al observar la Figura 10 surge la pregunta acerca de la linealidad de la incorporación de ^3H - leucina en virus y partículas totales pues la incorporación de radioactividad debería parar tan pronto como el "pool" de precursores radioactivos se acabe.

La Figura 11 muestra que la dilución de la marca tiene una eficiencia del 100% bajo las presentes condiciones de trabajo. La incorporación de ^3H - leucina en polipéptidos ácido - insolubles es innibida inmediatamente después de la dilución con exceso de leucina no radioactiva. Además en cada gradiente fueron re-

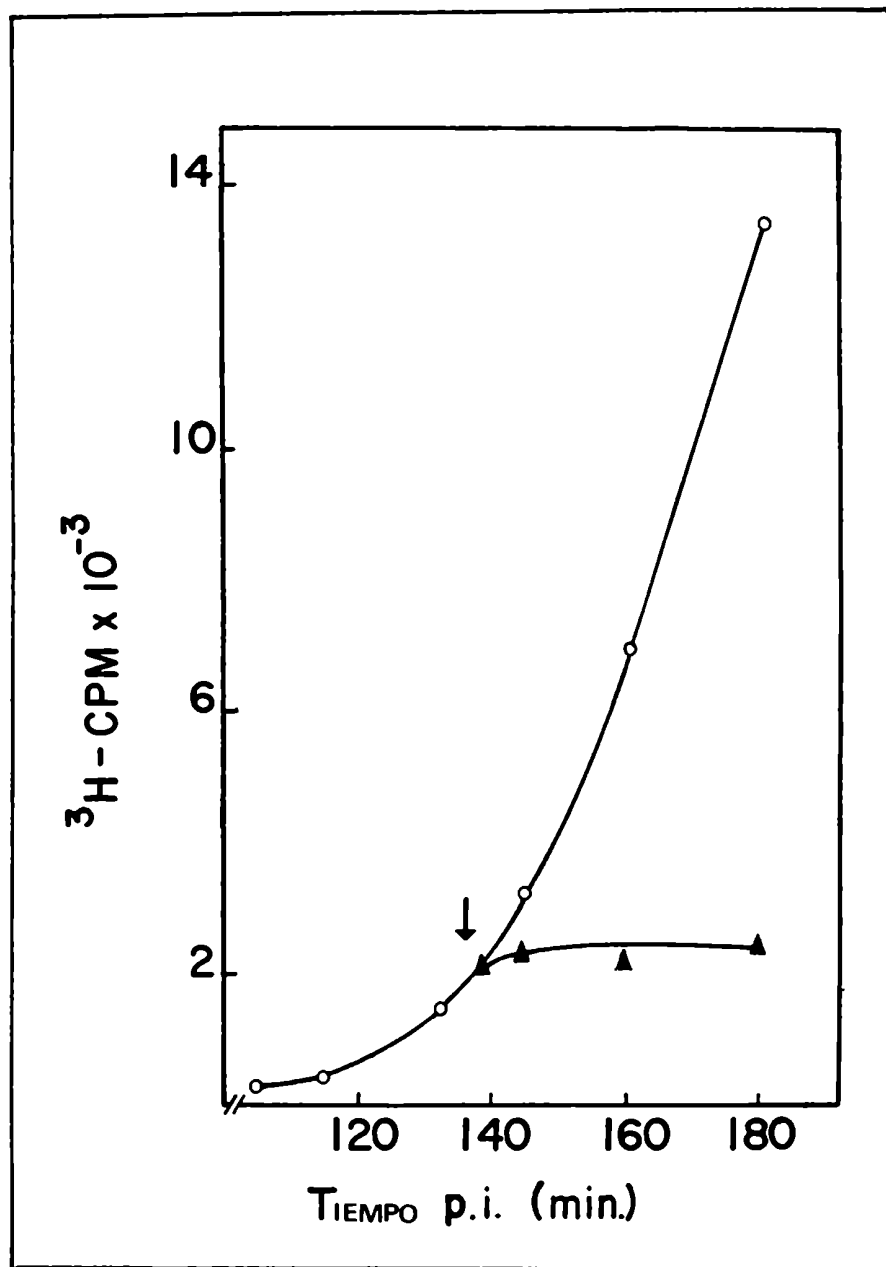


Figura 11

FIGURA 11Comprobación de la eficiencia del procedimiento de dilución
de la radioactividad

Un total de 2×10^7 células BHK₂₁ clon 13S infectadas fueron marcadas a los 90 minutos p.i. con 30 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H - leucina en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D.

A los 130 minutos p.i., el cultivo fue dividido en dos alícuotas, éstas fueron centrifugadas y las células fueron resuspendidas en el mismo medio (○) o en MEM leucina 100 X (▲).

Se continuó la incubación hasta los 180 minutos p.i. Se tomaron muestras a diferentes tiempos del ciclo de infección y se analizó la radioactividad TCA - precipitable.

La flecha indica el momento en que se inició el período de dilución de la marca.

cuperadas cantidades iguales de radioactividad ácido - precipitable (Figura 9). De este modo se comprobó la eficiencia del proceso de dilución de la marca. Por otra parte, resultados similares a los mostrados en la Figura 10 fueron obtenidos en sucesivos experimentos en los que el pulso radioactivo varió entre 6 y 20 minutos, dejando de lado la posibilidad de un artefacto experimental.

En aquellos experimentos en los que el pulso radioactivo fue extremadamente corto (menos de tres minutos), se obtuvo un flujo casi total de radioactividad de precursores marcados a productos finales. Sin embargo, bajo estas condiciones, la incorporación de ^3H - leucina en virus y procápsides fue muy baja y de ahí que no se puedan presentar datos cuantitativos confiables.

Los resultados anteriores y aquellos que se muestran en la Figura 10 sugieren la existencia de un "pool" de precursores estructurales. Por otra parte, la innibición aparente de la síntesis de procápsides entre 25 y 70 minutos después de la dilución de la marca podría ser explicada de dos modos diferentes:

* las procápsides no son precursores virales y su síntesis alcanza un máximo y luego se detiene.

* la velocidad de síntesis de procápsides a partir de sus precursores radioactivos y la velocidad de síntesis de virus a partir de procápsides se igualan después de los 25 minutos luego de la dilución de la marca y por eso no se puede observar acumulación de procápsides.

El siguiente experimento fue diseñado para esclarecer este problema. Las células BHK₂₁ clon 13S infectadas fueron marcadas con ¹⁴C - lisina a los 115 minutos p.i. y 20 minutos más tarde fueron marcadas con un pulso de ³H - leucina que duró 6 minutos. Las células fueron posteriormente incubadas durante tiempos diferentes en presencia de MEM libre de lisina, conteniendo 100 X de leucina sin marcar y ¹⁴C - lisina.

Las cinéticas de síntesis de procápsides y virus están graficadas en las Figuras 12 y 13. La Figura 12 muestra que la síntesis de procápsides y virus sigue una cinética exponencial cuando no se retira la radioactividad del medio. Sin embargo, se obtuvo un comportamiento similar al de la figura 10 para virus y procápsides marcados con ³H - leucina después que se realizó la dilución de la marca (Figura 13).

La Figura 14 muestra que el cociente ³H/ ¹⁴C en procápsides marcadas decrece notablemente a medida que transcurre el tiempo. Este hecho señala una síntesis continua de procápsides entre los 25 y 70 minutos luego de la dilución de la marca y apoya un mecanismo activo de síntesis de procápsides y su posterior conversión a viriones.

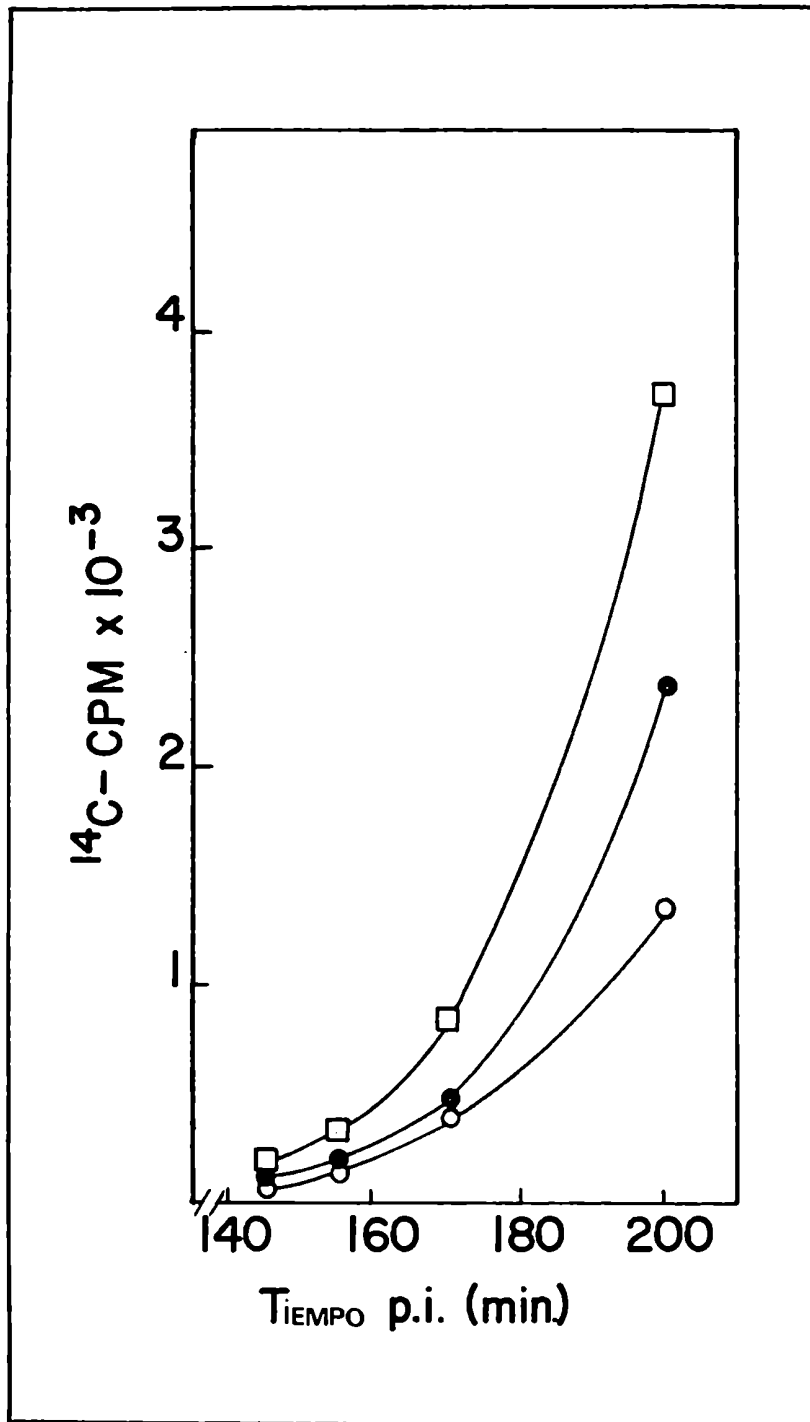


Figura 12

FIGURA 12

Síntesis de viriones y procápsides marcados con ^{14}C - lisina
en células infectadas marcadas mediante un pulso de ^3H - leu-
cina y en forma constante con ^{14}C - lisina

5×10^7 células infectadas fueron marcadas radioactivamente a los 115 minutos p.i. con $5 \mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C - lisina y 20 minutos después con $90 \mu\text{Ci/ml}$ de ^3H - leucina por espacio de 6 minutos.

Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en MEM leucina 100 X suplementado con $5 \mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C - lisina. Se tomaron alícuotas idénticas a diferentes tiempos y los extractos citoplasmáticos junto a sus correspondientes sobrenadantes fueron procesados y analizados como se describió en Materiales y Métodos.

La cantidad de radioactividad en procápsides (○), viriones (●) y partículas totales (□) fue calculada para cada muestra como se describe en la leyenda de la Figura 10.

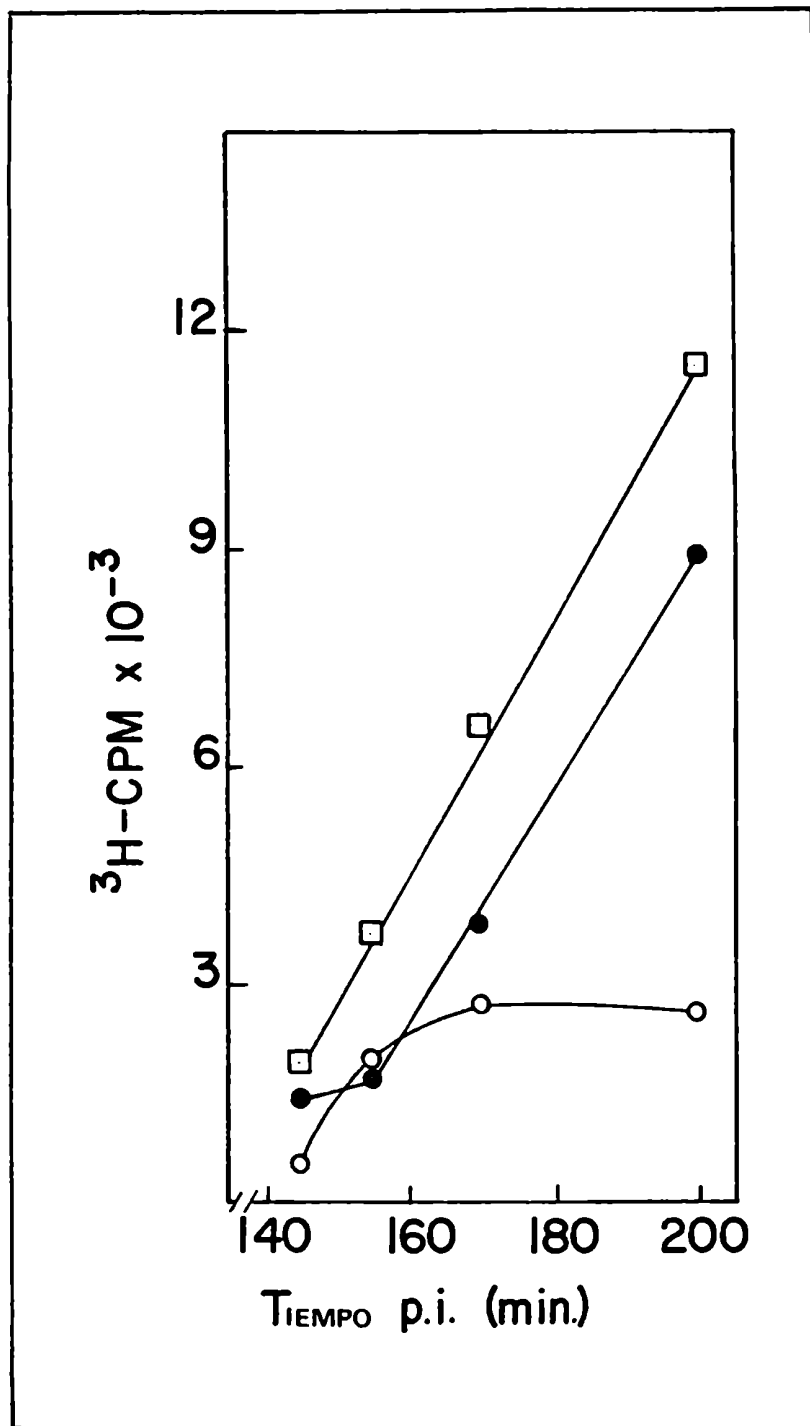


Figura 13

FIGURA 13

Síntesis de viriones y procápsides marcados con ^3H - leucina
en células infectadas marcadas mediante un pulso de ^3H - leu-
cina y en forma constante con ^{14}C - lisina

Las condiciones de la experiencia son las que se describen en la leyenda de la Figura 12.

La cantidad de radioactividad en procápsides (○), viriones (●) y partículas totales (□) fue calculada para cada muestra como se describe en la leyenda de la Figura 10.

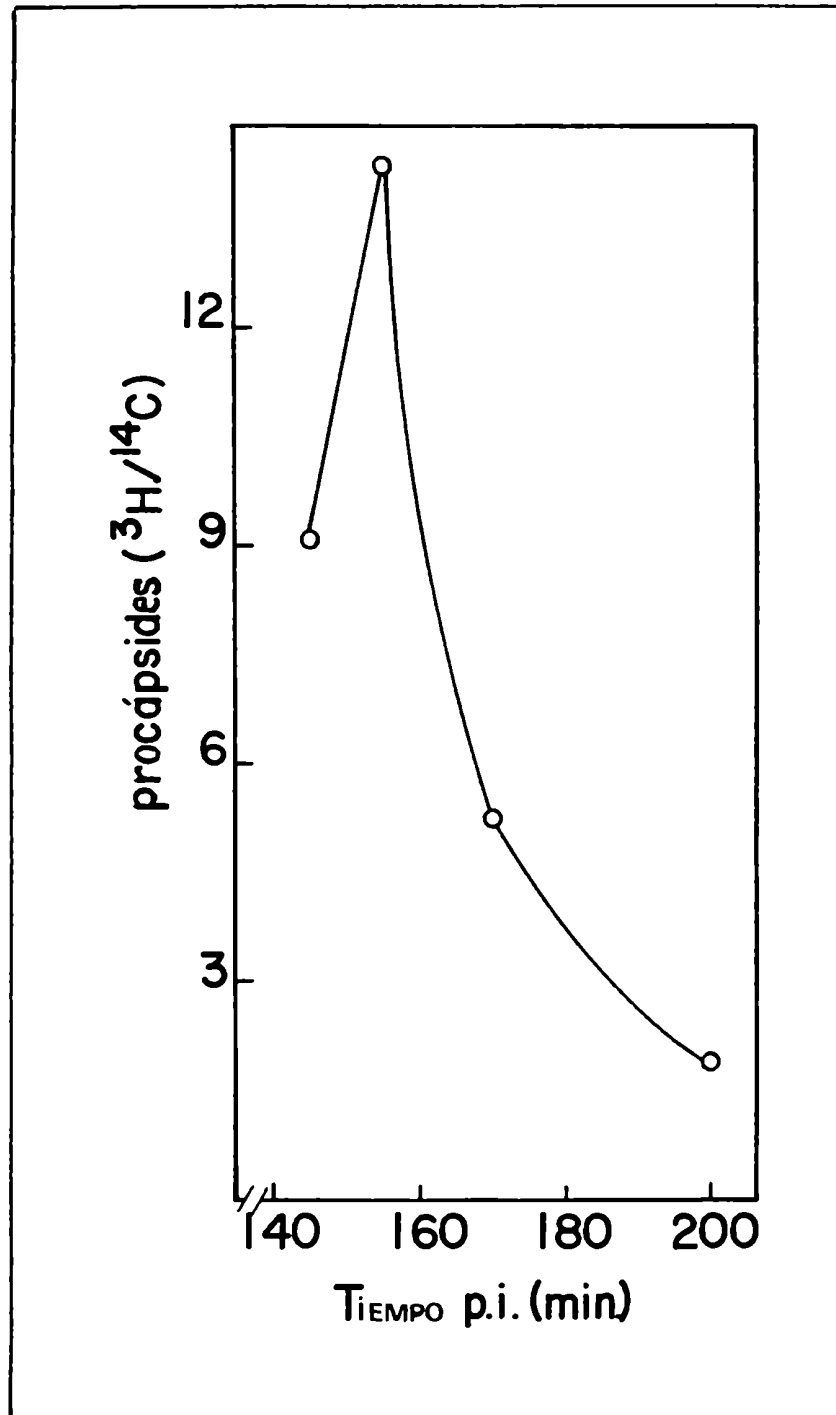


Figura 14

FIGURA 14

Relación entre procápsides marcadas con ^3H - leucina y procápsides marcadas con ^{14}C - lisina

Las condiciones de la experiencia son las que se describen en la leyenda de la Figura 12.

La cantidad de radioactividad en procápsides marcadas en forma constante con ^{14}C - lisina y mediante un pulso de ^3H - leucina fue calculada para cada muestra como se expresa en la leyenda de la Figura 10.

El pasaje de procápsides a viriones en presencia de cicloneximida

La cicloheximida bloquea inmediatamente la síntesis de proteínas en células BHK infectadas. No obstante, durante 20 minutos se detecta actividad de replicasa remanente (129). La síntesis del precursor de proteínas estructurales estaría completamente inhibida mientras que durante los primeros 20 minutos de incubación en presencia de cicloneximida, la síntesis de RNA proseguiría. De este modo sería factible detectar el incremento de radioactividad en viriones junto con el correspondiente y simultáneo decrecimiento de la radioactividad en procápsides.

Células infectadas fueron marcadas con un pulso de ^3H - leucina entre los 130 y 140 minutos p.i. y el período de dilución de la marca duró 20 minutos (éste es el tiempo correspondiente a la máxima relación procápsides a virus, ver Figura 9). Se agregó cicloheximida a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se tomaron muestras idénticas a diferentes tiempos que fueron posteriormente analizadas para determinar la presencia de virus y procápsides.

Los perfiles de los gradientes de sacarosa que se muestran en la Figura 15 indican que aún en presencia de cicloneximida la formación de virus se lleva a cabo mientras que la cantidad de procápsides decrece fuertemente con el tiempo.

En la Tabla II se ve un resumen comparativo de la cantidad de radioactividad incorporada en procápsides y viriones. En presencia

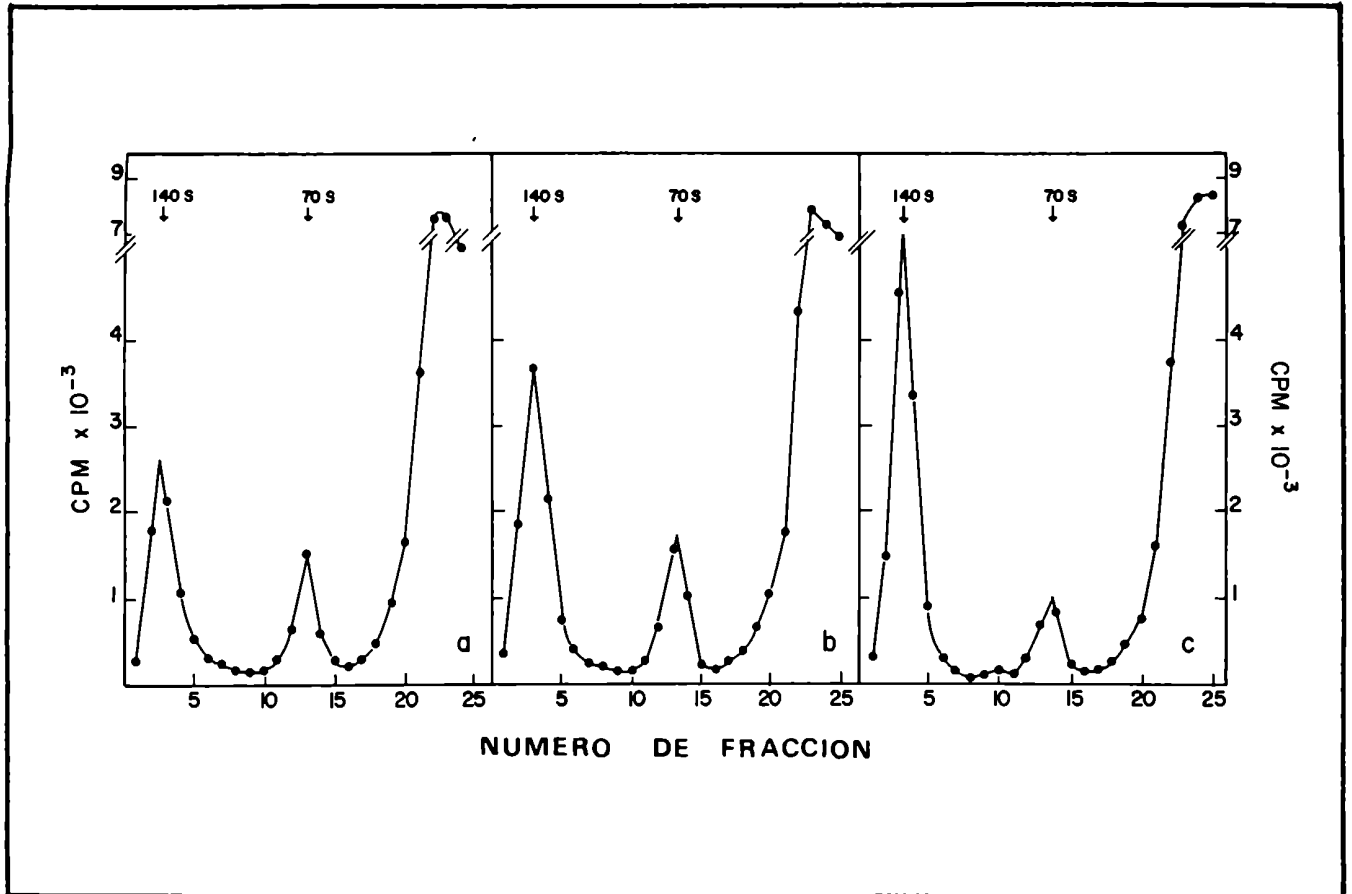


Figura 15

FIGURA 15Efecto de la cicloheximida sobre la síntesis de virus y procápsides

5×10^7 células infectadas fueron marcadas con un pulso de ^3H - leucina (90 $\mu\text{Ci/ml}$) de 10 minutos de duración a los 130 minutos p.i. en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D.

La dilución de la marca se llevó a cabo como ya se describió en la leyenda de la Figura 9.

A los 20 minutos de comenzado el período de dilución de la marca, se agregó cicloheximida a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Las muestras fueron cosechadas y procesadas del modo usual a los 10 (a), 25 (b) y 45 (c) minutos luego de iniciada la dilución de la radioactividad.

TABLA II

Efecto de la cicloheximida

sobre la síntesis de virus, procápsides y partículas totales

		Incorporación total (cpm)*		
Incubación con ³ H - leucina	Incubación con cicloheximida	Virus	Procápsides	Partículas totales
130 a 150 min.		5.660	3.390	9.050
130 a 165 min.	160 a 165 min.	8.890	3.760	12.650
130 a 185 min.	160 a 185 min.	10.850	1.940	12.790

* Los valores representan la integración de las áreas bajo los picos de la Figura 15

de ciclohexitida se obtiene un pasaje de radioactividad prácticamente cuantitativo de procápsides a viriones puesto que el decrecimiento de la radioactividad en la fracción correspondiente a procápsides entre 5 y 25 minutos luego de la adición del anti-oiótico, se correlaciona con el incremento de la marca en la fracción de virus durante el mismo período. La radioactividad presente en partículas totales permanece constante luego del tratamiento con ciclohexitida y esto muestra que se bloqueó completamente la dilución del "pool" de precursores.

Efecto de los inhibidores proteolíticos sobre la morfogénesis del virus de la Fiebre Aftosa

Se estudió el efecto de la tosil - lisil - clorometil cetona (TLCK) sobre la morfogénesis viral con la intención de determinar si los últimos pasos del proceso eran bloqueados por la adición de inhibidores del clivaje de los polipéptidos virales.

TLCK innibe los clivajes primarios e impide la síntesis normal de los polipéptidos estructurales (40). Sin embargo, cuando se lo usa en bajas concentraciones (10^{-4} M) no innibe la síntesis de ácidos nucleicos siempre que no sea agregado durante los primeros 120 minutos de la infección.

Las células infectadas fueron marcadas con ^3H - leucina a los 130 minutos p.i. y después de 10 minutos se llevó a cabo la di-

lución de la marca. La primera muestra fue colectada 20 minutos luego de la dilución de la marca y en ese momento se agregó TLCK en una concentración final de 10^{-4} M. Otras dos alícuotas fueron tomadas a los 45 y 70 minutos luego de la dilución de la marca y las muestras fueron entonces procesadas del modo usual.

Los resultados se pueden ver en la Figura 16 y demuestran que la adición de TLCK no innibe el último paso de la morfogénesis viral.

Es más, es posible detectar un pasaje cuantitativo de radioactividad de procápsides a partículas virales.

Como conclusión, la inhibición de la síntesis de precursores estructurales permite la detección del pasaje de procápsides a partículas virales completas.

Hemos observado resultados similares mediante el uso de iones Zn^{++} como innibidores de la actividad proteolítica, pero en este caso la síntesis de partículas totales o de viriones fue lineal hasta los 50 minutos después del agregado del inhibidor.

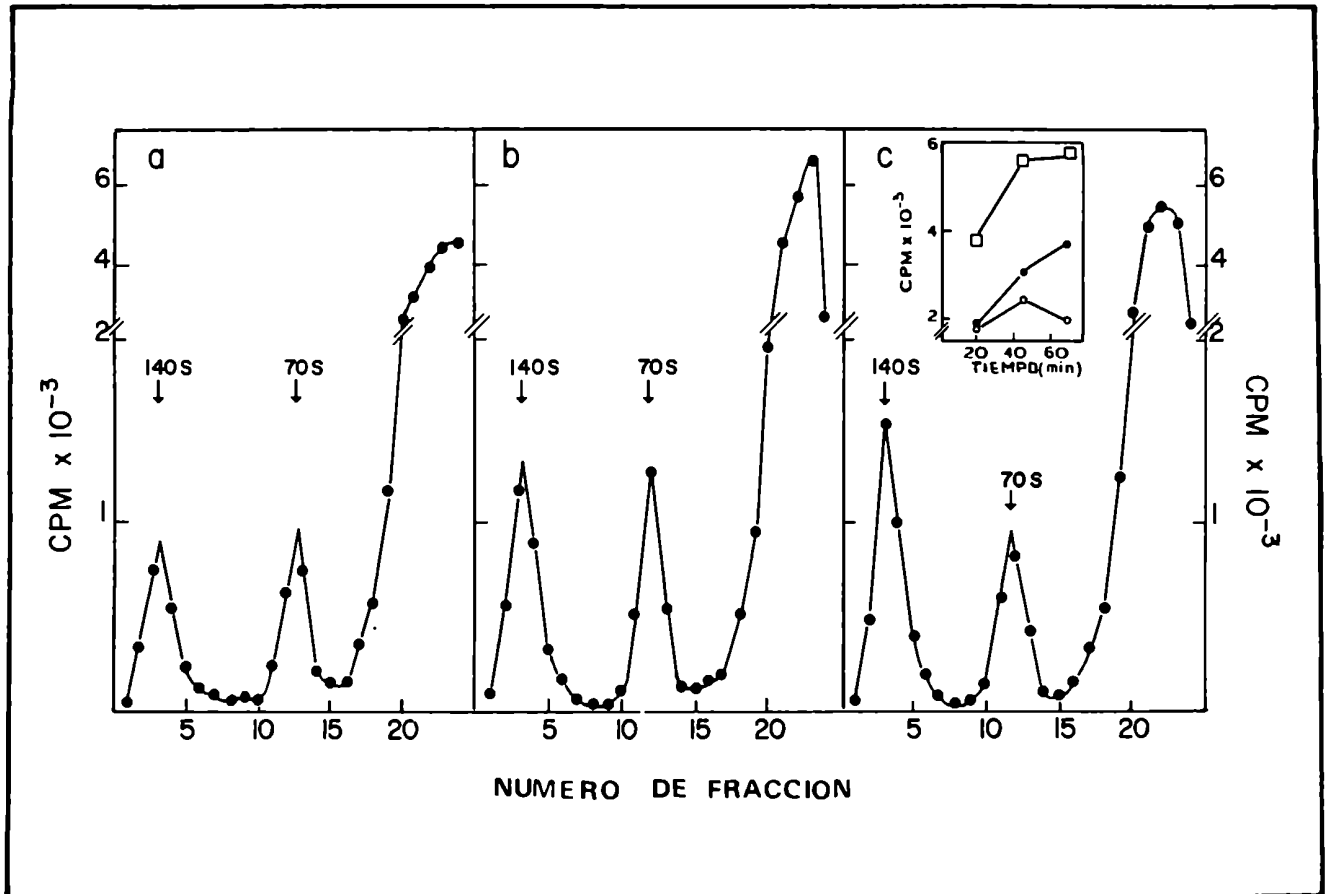


Figura 16

FIGURA 16Efecto del TLCK sobre la síntesis de virus y procápsides

Se infectaron y marcaron radioactivamente con ^3H - leucina 5×10^7 células BHK₂₁ clon 13S bajo las condiciones especificadas en la leyenda de la Figura 15. La dilución de la radioactividad se realizó del modo ya descrito en el texto y se incorporó TLCK a una concentración final 10^{-4} M a los 20 minutos de comenzada la misma.

Se tomaron muestras a los 20 (a), 45 (b) y 70 minutos (c) luego de iniciado el período de dilución de la marca y fueron procesadas del modo habitual.

El inserto en (c) muestra la síntesis de procápsides (○), viriones (●) y partículas totales (□) durante el lapso de dilución de la radioactividad. Los cálculos se efectuaron como se describe en la leyenda de la Figura 10. El tiempo en abcisas se indica a partir del momento que se realiza la dilución de la marca.

DISCUSION

Las etapas tempranas de la morfogénesis de Picornavirus fueron bien estudiadas en los géneros Cardiovirus (EMC) (99) (100), Rinovirus (rhinovirus 1A) (100) y Enterovirus (poliovirus) (101 a 107).

Ello fue posible debido a la elevada recuperación de pentámeros de coeficiente de sedimentación 14 S que constituyen el intermedio morfogenético precursor directo de las procápsides.

Para el género Aftovirus hemos encontrado que la detección y estudio de dicho precursor (trímero de coeficiente de sedimentación 10 S) presenta los inconvenientes que se enumeran a continuación:

- * hidrofobicidad
- * dificultosa elución de las membranas lisas
- * necesidad de gran precisión en el momento de la marcación y en la duración del pulso radioactivo
- * impracticabilidad de experimentos cinéticos y de autoensamblaje "in vitro"

La hidrofobicidad de las subestructuras del virus de la Fiebre Aftosa ya se puso en evidencia al purificar en gradientes de sacarosa subunidades 12 S provenientes de virus disociado a bajo pH (Figura 2). El 70% de las partículas 12 S se pierde durante la purificación asociado al material de vidrio cuando éstas no están formando parte del virus. Este hecho no había sido comunicado para ningún miembro de la familia Picornaviridae.

Debido a la similitud entre la composición de las partículas 12 S y la esperada para el precursor de las procápsides, se perfeccionó la metodología con el objeto de aumentar la recuperación de este último.

El empleo de siliconas para el tratamiento del material así como la presencia de albúmina en el buffer de corrida durante la ultracentrifugación de los extractos citoplasmáticos minimizaron la pérdida por hidrofobicidad del intermediario 10 S. Esto se puso en evidencia al recuperar el 100% de subunidades 12 S producidas por ruptura del virus a bajo pH y al hallarse la subunidad 5 S proveniente de la disociación de las mismas. Esta constituye la primera comunicación acerca de la existencia en Picornavirus de un producto de ruptura por acidez de coeficiente de sedimentación 5 S.

El proceso morfogénético de Picornavirus se encuentra asociado íntimamente a estructuras celulares membranosas. Con el fin de facilitar la elución de precursores localizados en las mismas, se introdujeron mejoras en los métodos de preparación de extractos citoplasmáticos; el empleo de DOC permitió incrementar la concentración de precursor.

El pulso radioactivo debió ser preciso en cuanto al momento del ciclo de infección en que fue realizado; si se efectuaba antes de alcanzado el 80% de síntesis de RNA, la marcación inespe-

cífica en la zona de estudio aumentaba y en el caso de efectuarse después, el precursor radioactivo no ingresaba a la célula.

Con respecto al tiempo de duración del pulso, se encontró que con tiempos mayores de 5 minutos se incrementaba la marcación inespecífica.

Los experimentos cinéticos para cuantificar el flujo de radioactividad hacia procápsides y los de autoensamblaje de precursores de procápsides "in vitro" requieren una concentración elevada de los mismos.

El objetivo que se perseguía con su realización era la determinación inequívoca del rol precursor - producto entre partículas 10 S y procápsides. Esto no fue posible debido a que la vida media del trímero (10 S) es sumamente corta y, por ende, no se lo pudo obtener en gran cantidad.

A pesar de todos los impedimentos, se determinó la presencia de un intermediario de coeficiente de sedimentación 10 S estable. Las condiciones experimentales fueron reproducibles y su detección resultó independiente del sistema celular empleado.

Los intentos de caracterización electroforética del intermediario 10 S se vieron dificultados por la presencia de contaminantes virales estructurales y no estructurales en todo el gradiente: P₁₀₀, P₈₈, P₇₂, P₅₂, P₃₈ (VP₀), P₃₄, VP₁, VP₃. Estos no permitieron detectar diferencias en la calle 4 de la Figura 7

donde han sido sembradas las fracciones correspondientes al pico del precursor.

Se observó una marcación prioritaria en la polimerasa viral P_{56a}, lo cual es lógico debido a que se trata de un producto final mientras que los demás polipéptidos sufren procesamientos posteriores. Lo que no resulta sencillo de explicar hasta el momento es el por qué de su presencia y la de su precursor P₇₂ a lo largo de todo el gradiente e incluso en el fondo del tubo donde ambos polipéptidos contaminan el precipitado de procápsides (calle 1 de la Figura 7).

Ya habían sido reportadas contaminaciones de este tipo en experimentos realizados con el virus de la encefalomiocarditis (EMC) (99), Picornavirus perteneciente al género Cardiovirus. Es probable que a pesar del enérgico tratamiento con detergentes no se eliminen totalmente estructuras membranosas que cosedimentan a lo largo del gradiente con proteínas estructurales y no estructurales del virus de la Fiebre Aftosa.

Mediante la determinación cromatográfica de las masas de las cadenas polipeptídicas y conociendo las propiedades de las subunidades monoméricas y pentaméricas del Picornavirus Maus Elberfeld (22) (130) pudieron calcularse los coeficientes de sedimentación de los protómeros y oligómeros. Puede verse en la Tabla I confeccionada a partir de estos datos, que el coeficiente de sedimen-

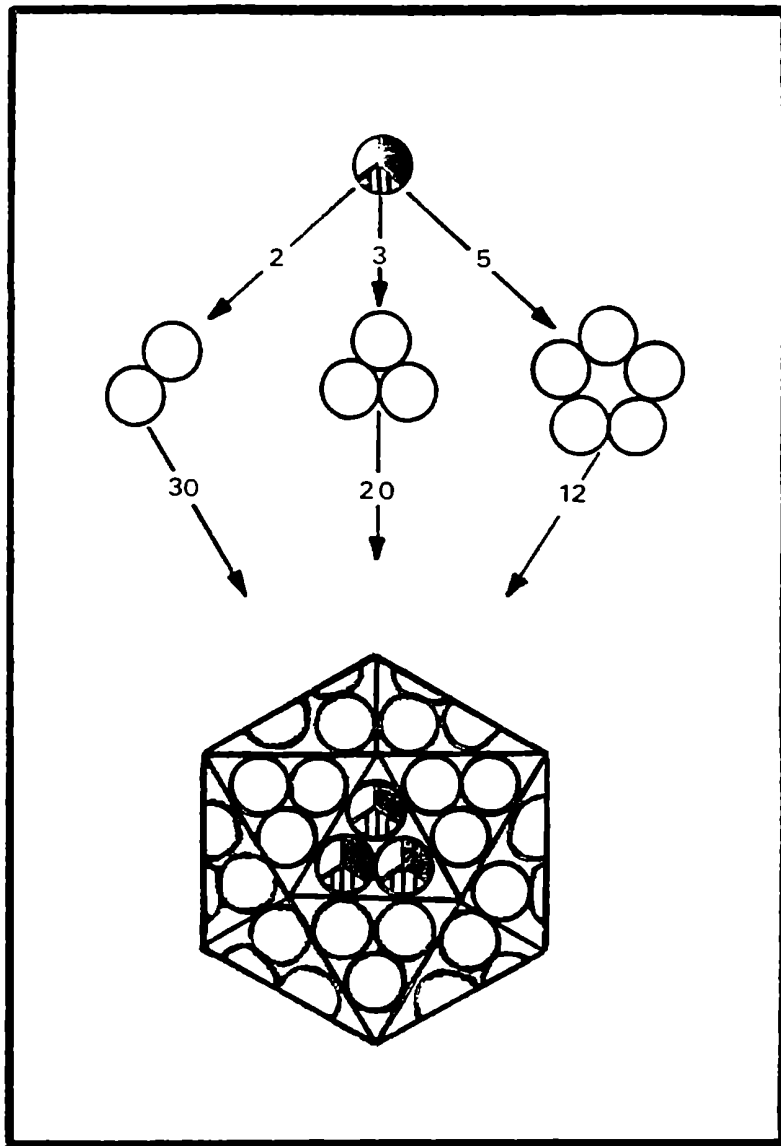
ción del intermediario detectado es el que corresponde a una estructura de trímero: 10 S.

Experimentos realizados con otros Picornavirus mostraron que las procápsides se ensamblan a partir de pentámeros de coeficiente de sedimentación 14 S y composición proteica (VP_0 , VP_1 , VP_3). Sin embargo, existen tres caminos posibles para el ensamblaje de una cápside de 60 subunidades, tal como la que presentan estos virus (Figura 17):

- * a partir de la unión de 30 dímeros
- * a partir de la unión de 20 trímeros
- * a partir de la unión de 12 pentámeros

El proceso de ensamblaje de Aftovirus se llevaría a cabo vía un intermediario morfogenético diferente al hallado en otros Picornavirus. Es probable que el resultado de la unión de 20 trímeros (10 S) sea una estructura más "abierta" y algo más lábil que aquélla que se obtendría por unión de 12 pentámeros. Esto permitiría explicar ciertas características distintivas del género tales como la inestabilidad a pH inferior a 7 y la mayor densidad de flotación en gradientes de ClCs.

Además, en ningún momento se ha detectado la presencia de intermediarios morfogenéticos pentaméricos para el virus de la Fiebre Aftosa bajo las condiciones de trabajo utilizadas. Por lo tanto, para este género el ensamblaje de la procápside se efectuaría



Figura

FIGURA 17

Caminos posibles para el ensamblaje de una cápside de sesenta
subunidades

La figura es una adaptación de un esquema de R.R.Rueckert (22).

Los monómeros han sido divididos en tres zonas (blanca, negra, rayada) con el propósito de mostrar gráficamente que en su composición intervienen tres proteínas: VP_0 , VP_1 y VP_3 .

a partir de trímeros a diferencia de otros miembros de la familia que lo hacen mediante pentámeros.

El papel desempeñado por las procápsides en el proceso de ensamblaje de los Picornavirus ha sido objeto de controversias.

Uno de los principales problemas que interfieren con el estudio del rol de las procápsides durante la morfogénesis es su contaminación con ribonucleoproteínas (121). En este estudio, la contaminación fue evitada mediante el uso de EDTA y RNasa.

Se estableció la relación precursor - producto entre procápsides y viriones mediante experimentos de pulso y dilución de la marca con células BHK₂₁ infectadas con el virus de la Fiebre Afosa. Sin embargo, no pudo ser observada una recuperación cuantitativa de radioactividad de procápsides en viriones.

Los resultados obtenidos por el análisis de las cinéticas de síntesis de virus, procápsides y partículas totales pueden interpretarse del siguiente modo: la velocidad de síntesis de partículas totales es lineal desde el momento de adición de la radioactividad, sugiriendo que la morfogénesis es un proceso muy veloz. Corroboran este hecho la sedimentación de procápsides que puede apreciarse en la calle 1 de la Figura 7 (que, en las condiciones de trabajo empleadas, indica la velocidad del proceso) y la corta vida del intermediario 10 S.

Desde el momento que la velocidad de síntesis de partículas totales no disminuye durante el paso de dilución de la marca, se puede asumir la existencia de un "pool" de precursores estructurales.

La cinética de síntesis de partículas virales podría analizarse más profundamente considerando los primeros pasos después de la marcación y los primeros momentos luego de la dilución de la marca. Durante aproximadamente 18 minutos, la velocidad de síntesis viral está por debajo de aquélla de partículas totales. Esto podría explicarse considerando que durante ese período los polipéptidos estructurales son marcados y posteriormente integrados al "pool" de precursores virales. Una vez que la incorporación de precursores radioactivos al "pool" llega a su fin, la síntesis viral adquiere una velocidad lineal que es idéntica a aquélla de las partículas totales.

De esta forma, la velocidad de síntesis de virus a partir de procápsides y la velocidad de síntesis de procápsides a partir de sus precursores resultan idénticas. Las diferencias que existen entre las velocidades de síntesis de procápsides y virus durante los primeros 25 minutos luego de la dilución de la marca darían como resultado una acumulación de procápsides que no serían afectadas luego de este período inicial.

Se obtuvo una recuperación cuantitativa de procápsides en viriones impidiendo la dilución de los precursores estructurales radioactivos. Con este propósito se usó cicloneximida que inhibe la síntesis de proteínas pero no la de RNA a través de la replicasa remanente cuya vida media es de 18 minutos (129). Estos datos indican que la inhibición de la síntesis de proteínas resulta en una inhibición de la síntesis de procápsides sin afectar el ensamblaje de las partículas totales. Esto sugiere que este paso morfogénético sólo requiere la disponibilidad de ácido nucleico y procápsides.

Una recuperación cuantitativa de procápsides en viriones también se observó cuando se bloqueó la síntesis de nuevos precursores estructurales durante el período de dilución de la marca mediante el uso de inhibidores de la actividad proteolítica. Sin embargo, en presencia de TLCK o iones Zn^{++} se lleva a cabo la síntesis de virus, lo que sugiere que este paso morfogénético no se afecta.

El hecho de que las velocidades de síntesis de virus y procápsides permanezcan constantes durante 20 minutos después de la adición de TLCK también sugiere que el "pool" de precursores consiste en componentes estructurales que no requerirían ninguna actividad proteolítica para sintetizar procápsides.

Se podría concluir que el clivaje de VP_0 no estaría mediado

a través de proteasas sensibles a TLCK, sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que este "pool" sea clivado por proteasas no sensibles a TLCK.

Si el "pool" intracelular de precursores estructurales estuviera constituido por el intermediario de coeficiente de sedimentación 10 S, éste podría ser aislado en concentraciones elevadas, por lo que dicha posibilidad debe ser descartada.

Lo anteriormente expuesto permite sugerir que el mencionado "pool" estaría formado por monómeros de composición (VP_0 , VP_1 , VP_3) y coeficiente de sedimentación 4,5 S.

La postulación de esta composición para el "pool" de precursores en lugar del pclipéptido P_{88} se basa en:

a) experimentos descritos, realizados en presencia de TLCK y Zn^{++} , inhibidores proteolíticos que no bloquearon el procesamiento de dicho "pool" para dar viriones como producto final.

b) preponderancia de la proteína VP_0 respecto de P_{88} en la zona de coeficiente de sedimentación 4,5 S del gradiente de sacarosa (calle 6 de la Figura 7).

El monómero (VP_0 , VP_1 , VP_3) se ensamblaría con dos estructuras semejantes para dar como resultado el trímero descrito como intermediario: $(VP_0, VP_1, VP_3)_3$ (10 S).

Es conveniente enfatizar que existen grandes diferencias en el proceso morfogenético del virus de la Fiebre Aftosa respecto del

de otros Picornavirus:

* El polipéptido precursor de proteínas estructurales P_{88} sería clivado en VP_0 , VP_1 y VP_3 para formar el monómero que constituiría el "pool" de precursores estructurales.

* Los monómeros se ensamblarían en trímeros, intermediarios morfogénéticos de coeficiente de sedimentación 10 S.

* No se detecta la presencia de provirión como precursor inmediato del virión en nuestras condiciones de trabajo.

Estas diferencias señalan estructuras virales distintas y se reflejan en las características peculiares del género Aftovirus.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten sugerir que la secuencia de ensamblaje de Aftovirus es particular para el género y procede como se describe a continuación (Figura 18):

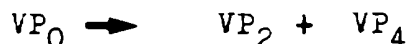
* El RNA viral es traducido en una poliproteína que sufre clivajes por proteasas celulares para dar los productos primarios P₂₀, P₈₈, P₅₂ y P₁₀₀.

* El precursor de proteínas estructurales P₈₈ es posteriormente clivado en VP₀, VP₁ y VP₃ por proteasas virales. Esta estructura se mantiene conesiva, es el monómero 4,5 S que constituye el "pool" de precursores estructurales.

* A continuación se ensamblan las subunidades 4,5 S para conformar un trímero: la partícula 10 S.

* La procápside se forma por unión de 20 trímeros, cada uno de los cuales representa una de las caras del icosaedro.

* El proceso morfogenético se completa con la encapsidación del RNA y el clivaje de la proteína VP₀



Con este paso queda conformado el virión maduro.

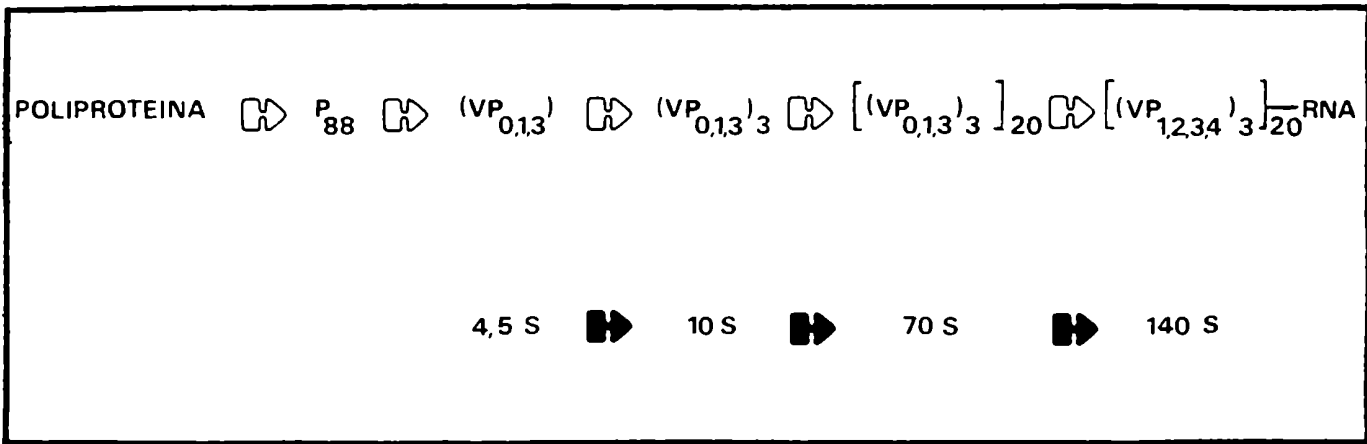
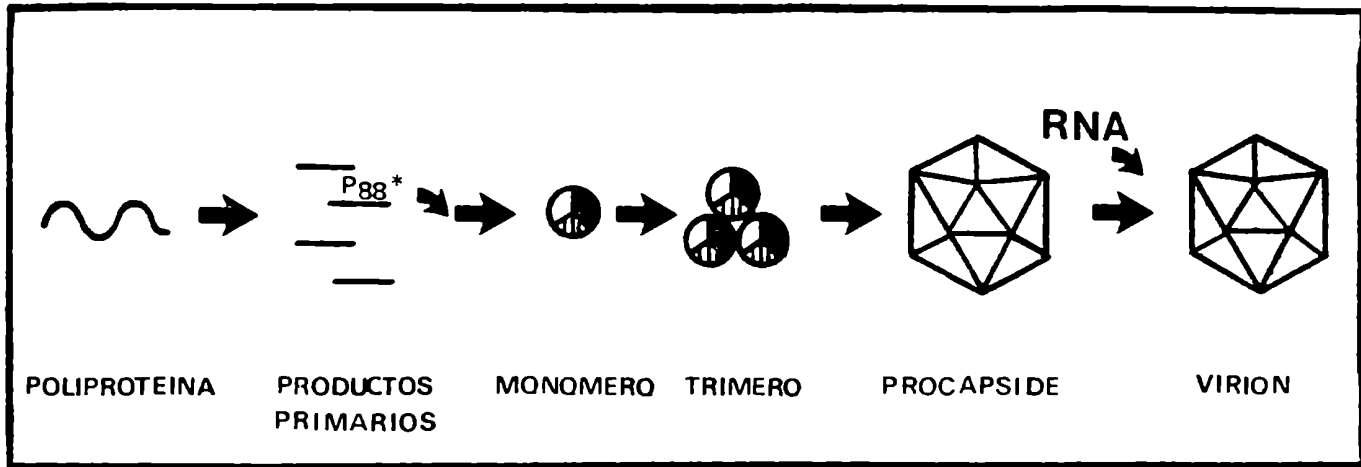


Figura 18

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

BIBLIOGRAFIA

1. Fracastorius, H., (1546) De Contagione et Contagiosis Morbis et Curatione. Libro 1, Cap. 12.
2. Loeffler, F., Frosch, P., (1897) Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I, Orig. 22 (257-259).
3. Plummer, G., (1965) Arch. Ges. Virusforsch. 12, (694-700).
4. van Bekkum, J.G., Frenkel, H.S., Fredericks, H.H.J., Frenkel, S., (1959) Tijdschr. Diergeneesk., 84, (1159-1164).
5. Sutmöller, P., Cotrall, G.E., Mc Vicar, J.W., (1967) Proc. U. S. Livestock Sanit. Assoc. (trabajo presentado en la reunión científica de Phoenix, Arizona).
6. Sutmöller, P., Mc Vicar, J.W., Cotrall, G.E., (1968) Arch. Ges. Virusforsch., 23, (227-235).
7. Fagg, R.H., Hyslop, N.St.G., (1966) J. Hyg., 64, (397-404).
8. King, A.M.Q., Underwood, B.O., Mc Canon, D., Newman, J.W.I., Brown, F., (1981) Nature, 293, (479-480).
9. Cooper, P.D., Agol, V.I., Bachrach, H.L., Brown, F., Ghendon, Y., Gibbs, A.J., Gillespie, J.H., Lonberg - Holm, K., Mandel, B., Melnick, J.L., Mohanty, S.B., Povey, R.C., Rueckert, R.R., Schaffer, F.C., Tyrrell, D.A.J., (1978) Intervirology, 10, (165-180).
10. Bachrach, H.L., Breese, S.S.Jr., Callis, J.J., Hess, W.R., Patty, R.E., (1957) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 95, (147-152).
11. Trautman, R., Breese, S.S.Jr., (1962) J. Gen. Microbiol. 27, (231-239).
12. Porter, A., Carey, N.H., Fellner, P., (1974) Nature, 248, (675-678).

13. Brown, F., Newman, J.F.E., Stott, J., Porter, A., Frisby, D., Newton, C., Carey, N., Fellner, P., (1974) *Nature*, 251, (342-344).
14. World Reference Laboratory, (1965) *Bull. Off. Int. Epiz.*, 63, (1655-1657).
15. Medappa, K.C., Rueckert, R.R., (1974) *Abstr. Am. Soc. Microbiol.*, 207.
16. Medappa, K.C., Mc Lean, C., Rueckert, R.R., (1971) *Virology*, 44, (259-270).
17. Maizel, J.V., (1966) *Science*, 151, (988-990).
18. Maizel, J.V., Phillips, B.A., Summers, D.F., (1967) *Virology*, 32, (692-699).
19. Maizel, J.V., Summers, D.F., (1968 b) *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.* 59, (966-971).
20. Talbot, P., Brown, F., (1972) *J. Gen. Virology*, 15, (163-170).
21. Vande Waude, G.F., Ascione, R., Card, J., Cowan, K.M., Polatnick, J., (1972 b) *Abstr. Am. Soc. Microbiol.*, 224.
22. Rueckert, R.R., (1976) *Comprehensive Virology*, Vol. 6, Cap. 5.
23. La Torre, J.L., Grubman, M.J., Baxt, B., Bachrach, H.L., (1980) *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.*, 77, (7444-7447).
24. Rowlands, D.J., Cartwright, B., Brown, F., (1969) *J. Gen. Virology*, 4, (479-487).
25. Talbot, F., Rowlands, D.J., Burroughs, J.N., Sangar, D.V., Brown, F., (1973) *J. Gen. Virology*, 19, (369-380).
26. Denoya, C.D., Scodeller, E.A., Vásquez, C., La Torre, J.L., (1978) *Arch. Virology*, 57, (153-159).

27. Schaffer, F.L., Schwerdt, C.E., (1955) Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A., 41, (1020-1023).
28. Schaffer, F.L., Schwerdt, C.E., (1959) Adv. Virus Res., 6, (159-204).
29. Finch, J.T., Klug, A., (1959) Nature, 183, (1709-1714).
30. Vázquez, C., Denoya, C.D., La Torre, J.L., Palma, E.L., (1979) Virol., 97, (195-200).
31. Bacnrach, H.L., Trautman, R., Breese, S.S., (1964) Am. J. Vet. Res. 25, (333-342).
32. Schulze, P., Gralheer, H., (1964) Acta Virol., 8, (473).
33. Wimmer, E., (1982) Cell, 28, (199-201).
34. Ambros, V., Baltimore, D., (1978) J. Biol. Chem., 253, (5263-5266).
35. Flanagan, J.B., Pettersson, R.F., Ambros, V., Hewlett, M.J., Baltimore, D., (1977) Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A., 74, (961-965).
36. King, A.M.Q., Sangar, D.V., Harris, T.J.R., Brown, F., (1980) J. Virol., 34, (627-634).
37. Forss, S., Schaller, H., (1982) Nucl. Ac. Res., 10, (6441-6450).
38. Sangar, D.V., (1979) J. Gen. Virol., 45, (1-13).
39. Bacnrach, H.L., (1977) Beltsville Symp. Agric. Res., (3-32).
40. Korant, B.D., (1972) J. Virol., 10, (751-759).
41. Butterworth, B.E., Rueckert, R.R., (1972) Virol., 50, (535-549).
42. Korant, B.D., (1973) J. Virol., 12, (556-563).

43. Korant, B.D., Butterworth, B.E., (1976) *J. Virol.*, 18, (298-306).
44. Chatterjee, N.K., Bachrach, H.L., Polatnick, J., (1976) *J. Virol.* 69, (369-377).
45. Sangar, D.V., Rowlands, D.J., Harris, T.J.R., Brown, F., (1977) *Nature*, 268, (648-650).
46. Rowlands, D.J., Harris, T.J.R., Brown, F., (1978) *J. Virol.*, 26, (335-343).
47. Sangar, D.V., Black, D.N., Rowlands, D.J., Harris, T.J.R., Brown, F. (1980) *J. Virol.*, 33, (59-68).
48. Korant, B.D., (1979) *The Molecular Biology of Picornaviruses*, editado por Perez - Bercoff. New York. Plenum Press.
49. Brown, F., Cartwright, B., Stewart, D., (1962) *B.B. Acta*, 55, (768-774).
50. Thorne, H.V., Cartwright, S.F., (1961) *Virol.*, 15, (245-247).
51. Thorne, H.V., (1962) *J. Bacteriol.*, 84, (929-942).
52. Vande Woude, G.F., Swaney, J.B., Bachrach, H.L., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, (1222-1229).
53. Pledger, R.A., (1961) *Virol.*, 13, (366-367).
54. Shahan, M.S., (1962) *Ann. N.Y. Acad. Scie.*, 101, (444-454).
55. Graves, J.H., (1963) *J. Immun.*, 91, (251-256).
56. Sruoar, B., (1966) *Vet. Med. Pragne*, 11, (551-558).
57. Schmidt, S., (1936) *Z. Immunitätforsch.*, 88, (91-103).
58. Waldmann, O., Kobe, K., (1938) *Berlin. tierärztl. Wochschr.*, 22, (317-320).

59. Frenkel, H.S., (1951) *Am. J. Vet. Res.*, 12, (187-190).
60. Mowat, G.N., Chapman, W.G., (1962) *Nature*, 194, (253-255).
61. Mc Kercher, P.D., Graves, J.H., (1977) *Develop. Biol. Standard*
35, (107).
62. Rivenson, S., (1979) *Rev. Med. Vet.*, 60, (22).
63. Rivenson, S., Ibarra, O., Gaggino, O., Laporte, O., García Ocano,
H., Pizzi, J.C., Marangunich, H., (1972) *Rev. Inv. Agrop. Serie*
4, IX (58).
64. Augé de Melo, P., Gómez, J., (1977) *Bltn. Centr. Panam. F. Aft.*,
27, (49).
65. Rivenson, S., Charles, E., Gaggino, O., Osorio, F., Laporte, O.,
(1979) *Gac. Vet.*, 41, (670).
66. Rivenson, S., Sadir, A.M., Gaggino, O., Marcovecchio, F.E., Zabal,
O., Laporte, O., (1982) *Rev. Med. Vet.*, 63, (364-370).
67. Skinner, H.H., (1954) *Nature*, 174, (1052-1053).
68. Gillespie, J.H., (1954) *Cornell Vet.*, 44, (425-433).
69. Brooksby, J.B., (1958) *Advan. Virus Res.*, 5, (1-37).
70. Skinner, H.H., (1952) *Nature*, 169, (794-795).
71. Raraf, A. Asso, J., Fougereau, M., Verge, J., Dhennin, Louis, Dhennin
Leone, (1962) *Compt. Rend.*, 254, (3924-3926).
72. Skinner, H.H., (1959) *Congr. Mund. Vet. Vol. II*, (391-393).
73. Palacios, C.A., (1968) *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 64, (386-410).
74. Mowat, G.N., Barr, D.A., Bennett, J.H., (1969) *Archiv. Ges.*
Virusforsch., 26, (341-354).

75. Mowat,G.N., Garland,A.J.M., Spier,R.E.,(1978) Vet. Rec., 102
(190-193).
76. Wild,T.F., Brown,F.,(1967) J. Gen. Virol., 1, (247-250).
77. Wild,T.F., Burroughs,J.N., Brown,F.,(1969) J. Gen. Virol.,
4, (313-320).
78. Matheka,H.D., Mayr,A., Boegel,K.,(1962) Zentr. Bakterirol.
Parasitenk. Abt.I, Orig. 187, (137-143).
79. Laporte,J., Grosclaude,J., Wantyghem,J., Bernard,S., Rouze,P.,
(1973) C.R.Hebd. Scéanc. Acad. Scie. Paris D 276, (3399-3401).
80. Bachrach,H.L., Moore,D.M., Mc.Kercher,P.D., Polatnick,J.,
(1975) J. Immun., 115, (1635-1641).
81. Kaaden,C.R., Adam,K.H., Strohmaier,K.,(1977) J. Gen. Virol.,
34, (397-400).
82. Bachrach,H.L., Morgan,D.O., Moore,D.M.,(1979) Interv., 12,
(65-72).
83. Meloen,R.H., Rowlands,D.J., Brown,F.,(1979) J. Gen. Virol.,
45, (761-763).
84. Küpper,H., Keller,W., Kurz,C., Forss,S., Schaller,H., Franze,
R., Strohmaier,K., Marquardt,O., Zaslavsky,V., Hofschneider,
P.H.,(1981) Nature, 289, (555-559).
85. Boothroyd,J.C., Highfield,P.E., Cross,G.A.M., Rowlands,D.J.,
Lowe,P.A., Brown,F., Harris,T.J.R.,(1981) Nature, 290, (800-802)
86. Kleid,D.G., Mc Kercher,P.D., Morgan,D.O., Robertson,B.H.,
Bachrach,H.L.,(1981) Science, 214, (1125-1128).

87. King, A.M.Q., Underwood, B.O., Mc Cahon, D., Newman, J.W.I., Brown, F., (1981) *Nature*, 293, (479-480).
88. Strohmaier, K., Franze, R., Adam, K.H., (1982) *J. Gen. Virol.*, 59, (295-306).
89. Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Howlands, D.J., Brown, F., (1982) *Nature*, 298, (30-33).
90. Jacobson, M.F., Baltimore, D., (1968) *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.*, 61, (77-84).
91. Kozak, M., (1978) *Cell*, 15, (1109-1123).
92. Jacobson, M.F., Asso, J., Baltimore, D., (1970) *J. Molec. Biol.*, 49, (657-669).
93. Summers, D.F., Shaw, E.N., Steward, M.L., Maizel, J.V., (1972) *Virol.*, 10, (880-884).
94. Kiehn, E.D., Holland, J.J., (1970) *J. Virol.*, 5, (358-367).
95. Palmenberg, A.C., Pallausch, M.A., Rueckert, R.R., (1979) *J. Virol.* 32, (770-778).
96. Butterworth, B.E., (1973) *Virol.*, 56, (439-453).
97. Holland, J.J., Doyle, J., Perrault, D., Kingsbury, D., Etchison, J. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 46, (634-639).
98. Lawrence, C., Thach, R.E., (1975) *J. Virol.*, 15, (918-928).
99. Mc Gregor, S., Hall, L., Rueckert, R.R., (1975) *J. Virol.*, 12, (1107-1120).
100. Mc Gregor, S., Rueckert, R.R., (1977) *J. Virol.*, 21, (548-553).

101. Phillips, B.A., Summers, D.F., Maizel, J.V., (1968) *Virology*, 35, (216-226).
102. Phillips, B.A., (1969) *Virology*, 39, (811-821).
103. Phillips, B.A., (1971) *Virology*, 44, (307-316).
104. Perlin, M., Phillips, B.A., (1973) *Virology*, 53, (107-114).
105. Perlin, M., Phillips, B.A., (1975) *Virology*, 63, (505-511).
106. Phillips, B.A., Wiemert, S., (1978) *Virology*, 88, (92-104).
107. Phillips, B.A., Lundquist, R.E., Maizel Jr., J.V., (1980) *Virology*, 100, (116-124).
108. Fernández Tomas, C., Baltimore, D., (1973) *J. Virology*, 12, (1122-1130).
109. Fernández Tomas, C., Guttman, N., Baltimore, D., (1973) *J. Virology*, 12, (1181-1183).
110. Guttman, N., Baltimore, D., (1977) *J. Virology*, 23, (363-367).
111. Yin, F.H., (1977) *Virology*, 82, (299-307).
112. Caliguiri, L.A., Tamm, I., (1970) *Virology*, 42, (100-111).
113. Lee, P.W.K., Paucha, E., Colter, J.S., (1978) *Virology*, 85, (286-295).
114. Lee, P.W.K., Colter, J.S., (1979) *Canad. J. Biochem.*, 57, (902-913).
115. Lee, P.W.K., Colter, J.S., (1979) *Virology*, 97, (266-274).
116. Su, R.T., Taylor, M.W., (1976) *J. Gen. Virology*, 30, (317-328).
117. Cowan, K.M., Graves, J.H., Trautman, R., (1968) *Virology*, 34, (269-274).
118. Rowlands, D.J., Sangar, D.V., Brown, F., (1975) *J. Gen. Virology*, 26, (227-238).

119. Jacobso, M.F., Baltimore, D., (1968) *J. Mol. Biol.*, 33, (369-378).
120. Ghendon, Y.E., Yakobson, E., Nikhejeda, A., (1972) *J. Virol.*, 10, (261-266).
121. Wright, P.J., Cooper, P.D., (1974) *Virology*, 59, (1-20).
122. Hoey, E.M., Martin, S.J., (1974) *J. Gen. Virol.*, 24, (515-524).
123. Eagle, H., (1955 b) *Science*, 122, (501-504).
124. Capstick, P.B., Garland, A.J.M., Chapman, W.G., Masters, R.C., (1967) *J. Hyg.*, 65, (273-280).
125. Stocker, M., Mac Pherson, I., (1964) *Nature*, 203, (1355-1357).
126. Laemmli, U., (1970) *Nature*, 248, (680-684).
127. Bonner, W.M., Laskey, R.A., (1974) *Eur. J. Biochem.*, 46, (83).
128. New England Nuclear. "A guide to autoradiography enhancement" (mayo 1981).
129. Firpo, E.J., comunicación personal.
130. Rueckert, R.R., Dunker, A.K., Stoltzfus, C.M., (1969) *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.*, 62, (912-919).