

Tesis de Posgrado

Variabilidad genómica de la cepa C3 resende del virus de la fiebre aftosa por pasajes seriados en distintos sistemas celulares

Kaplan, Gerardo

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Kaplan, Gerardo. (1986). Variabilidad genómica de la cepa C3 resende del virus de la fiebre aftosa por pasajes seriados en distintos sistemas celulares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1984_Kaplan.pdf

Cita tipo Chicago:

Kaplan, Gerardo. "Variabilidad genómica de la cepa C3 resende del virus de la fiebre aftosa por pasajes seriados en distintos sistemas celulares". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1984_Kaplan.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

VARIABILIDAD GENÓMICA DE LA CEPA C₃ RESENDE DEL VIRUS
DE LA FIEBRE AFTOSA POR PASAJES SERIADOS EN DISTINTOS SISTEMAS
CELULARES.

Gerardo Kaplan

Director de Tesis: Dr. Eduardo L. Palma.

Departamento de Virología

Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias
Biológicas

1986

A la memoria de Sofia Y. de Guelar

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp^r: Resistencia al antibiótico ampicilina.
Amp^s: Sensibilidad al antibiótico ampicilina.
Ci: Curio, unidad de radiactividad correspondiente a $2,2 \times 10^{12}$ desintegraciones por minuto.
c.p.e.: Efecto citopático.
c.p.m.: Cuentas por minuto.
DI: Defectivas interferentes.
DICT50: Dosis infecciosa cultivo de tejido 50%.
DL50: Dosis letal 50%.
DNA: Ácido desoxirribonucleico.
DNasa: Desoxirribonucleasa.
dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato.
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.
ddNTP: Didesoxirribonucleótido trifosfato.
ddNTPs: Didesoxirribonucleótidos trifosfato.
DTT: Ditiotreitól.
EDTA: Etilén diamino tetra acetato de sodio.
EMC: Virus de la encefalomiocarditis.
Kpb: Kilo pares de bases = 1.000 pares de bases.
MEM: Medio esencial mínimo Eagle.
m.o.i.: Multiplicidad de infección.
OD₂₆₀: Densidad óptica medida a una longitud de onda de 260nm.
pb: Pares de bases.
RFB: Riñón fetal bovino.
RNA: Ácido ribonucleico.
RNasa: Ribonucleasa.
r.p.m.: Revoluciones por minuto.
S: Svedberg, unidad de velocidad de sedimentación.
SDS: Dodecil sulfato de sodio.
SSC: Solución salina citrato.
TCA: Ácido tricloro acético.
TEMED: N, N, N',N'-tetrametilen diamina.

Tet^R: Resistencia al antibiótico tetraciclina.
Tet^S: Sensibilidad al antibiótico tetraciclina.
IFB: Testículo fetal bovino.
Tris: Tri-(hidroximetil) aminometano.
V: Voltios.
VFA: Virus de la fiebre aftosa.
VSV: Virus de la estomatitis vesicular.

ÍNDICE

	página	
1.	INTRODUCCIÓN.	1
1.1	INTRODUCCIÓN GENERAL.	2
1.2	SOBRE EL MECANISMO DE LA ALTA FRECUENCIA DE MUTACIÓN DE LOS VIRUS A RNA.	3
1.3	OTROS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A LA ALTA VARIABILIDAD DE LOS VIRUS A RNA.	
1.4	SOBRE LA RÁPIDA EVOLUCIÓN DE LOS GENOMAS A RNA.	
1.5	FACTORES QUE PROMUEVEN EL DESEQUILIBRIO EN LAS POBLACIONES DE RNA GENÓMICOS.	8
1.6	¿ES VENTAJOSA LA ALTA VARIABILIDAD PARA LOS GENOMAS A RNA?.	10
1.7	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PICORNAVIRUS.	12
1.8	LA FIEBRE AFTOSA.	14
1.8.1	Breve reseña histórica.	14
1.8.2	La enfermedad. Su distribución geográfica.	16
1.8.3	Inmunología y control de la enfermedad.	19
1.8.4	El RNA viral y sus productos genéticos.	21
1.8.5	El virión.	28
1.8.6	Ciclo de multiplicación viral.	31.
1.8.7	Efectos sobre la célula huésped.	33
1.8.8	Morfogénesis.	34
1.8.9	Variabilidad del VFA.	36
1.9	MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÓMICA DE LOS VIRUS A RNA.	39
1.10	OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.	42
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.	44
2.1	CÉLULAS.	45
2.2	VIRUS.	45
2.3	PROCEDIMIENTO DE CLONADO DEL VFA CEPA C ₃	

	RESENDE.	45
2.4	PASAJES SERIADOS DEL C3 CLON POR DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.	46
2.5	TITULACIÓN DE LOS VIRUS.	47
2.5.1	Titulación en cultivo de tejidos.	47
2.5.2	Titulación en ratón lactante.	47
2.6	PRODUCCION Y PURIFICACIÓN DE VIRIONES.	48
2.7	PREPARACIÓN DEL RNA VIRAL.	49
2.8	MAPÉO BIDIMENSIONAL DE OLIGONUCLEÓTIDOS.	50
2.8.1	Obtención de oligonucleótidos marcados "in vitro".	50
2.8.2	Obtención de RNA inducido marcado "in vivo" y su digestión con RNasa T1.	51
2.8.3	Condiciones de la electroforesis bidimensional.	52
2.9	CLONADO MOLECULAR DEL GENOMA DEL VFA.	53
2.9.1	Obtención de la primera cadena de cDNA.	53
2.9.2	Síntesis de la segunda cadena de cDNA.	55
2.9.3	Tratamiento con nucleasa S1.	55
2.9.4	Agregado de homopolímeros "pegajosos" en los extremos 3' del cDNA de doble cadena.	57
2.9.5	Anillado del cDNA con el plásmido pBR322.	58
2.9.6	Transformación de bacterias con plásmidos que contienen el cDNA del VFA, y selección de colonias Amp ^S y Tet ^r .	59
2.10	ANALISIS POR RESTRICCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE CONTIENEN EL cDNA DEL VFA.	60
2.11	PURIFICACIÓN DEL DNA DE PLÁSMIDOS.	62
2.12	SECUENCIACIÓN DEL DNA.	63
2.13	PREPARACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS E HIBRIDACIÓN EN COLONIAS.	64
2.14	MÉTODO DE SECUENCIACIÓN RÁPIDA DEL cDNA.	66
2.15	RECLONADO DE FRAGMENTOS EN EL PLÁSMIDO pSP64.	69
2.16	MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS EUCARIOTAS Y	

	BACTERIAS.	71
2.16.1	Medio MEM.	71
2.16.2	Medio MEM sin fosfato.	71
2.16.3	Medio LB.	71
2.17	TAMPONES.	71
2.18	OTROS MATERIALES.	72
3.	RESULTADOS.	73
3.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES OBTENIDAS POR PASAJES SERIADOS DE LA CEPA C ₃ RESENDE DEL VFA.	75
3.1.1	Tiempo en que se produce el efecto citopático total.	75
3.1.2	Infectividad para células de RFB y BHK-21.	79
3.1.3	Patogenicidad para ratón lactante.	81
3.1.4	Masa de viriones producida durante la la infección.	83
3.2	ANÁLISIS DEL GENOMA DE LAS POBLACIONES VIRALES OBTENIDAS DURANTE LOS PASAJES SERIADOS DEL C ₃ CLON POR LOS DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.	86
3.2.1	Análisis del genoma de las poblaciones virales no segregadas.	87
3.2.2	Análisis de la población viral obtenida en el pasaje BHK 15 mediante segregación por clonado de las subpoblaciones.	87
3.3	CLONADO MOLECULAR DEL GENOMA DEL VFA.	92
3.3.1	Obtención de sondas de cDNA correspondien- tes a regiones adyacentes a la proteína VP1	93
3.3.2	Clonado molecular de la cepa C ₃ Resende.	101
3.4	SECUENCIACIÓN DEL cDNA DEL CLON CORRESPON- DIENTE A LA REGIÓN ADYACENTE A VP1.	102
3.5	SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE DE VP1 DEL C ₃ CLON.	104

3.6	SECUENCIACION DE LA REGION CARBOXILO TERMINAL DE VP1 DE LAS POBLACIONES VIRALES OBTENIDAS DURANTE LOS PASAJES SERIADOS POR LOS DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.	110
4.	DISCUSIÓN.	118
4.1	EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES VIRALES DURANTE LOS PASAJES SERIADOS POR LOS DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.	119
4.2	¿TODOS LOS SEROTIPOS DEL VFA EVOLUCIONAN TAN RAPIDAMENTE?.	121
4.3	¿POR QUÉ LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS NO SE MANIFESTARON EN LOS MAPAS BIDIMENSIONALES DE OLIGONUCLEÓTIDOS RESISTENTES A LA RNasa T1?.	122
4.4	¿QUÉ PRESIONES ACTÚAN EN LA SELECCIÓN DE VARIANTES DEL VFA?.	124
4.5	¿POR QUÉ BUSCAR CAMBIOS EN VP1?.	125
4.6	¿SE ENCUENTRAN RELACIONADOS LOS MECANISMOS DE VARIACIÓN POR DERIVA ANTIGÉNICA Y POR SELECCIÓN DE LA CÉLULA HUÉSPED?	127
4.7	¿QUÉ SUCEDE DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL C ₃ CLON A TRAVÉS DE LOS PASAJES SERIADOS POR LOS DISTINTOS SISTEMAS CELULARES?.	128
5.	CONCLUSIONES.	130
6.	BIBLIOGRAFÍA.	135

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La gran plasticidad que presentan las formas de vida en la naturaleza se debe casi exclusivamente a la versatilidad de los ácidos nucleicos que componen los genomas de todos los seres vivos.

El mecanismo involucrado en esta alta maleabilidad de los ácidos nucleicos se basa en mutaciones originadas al azar, que permiten la adaptación y evolución de los organismos.

La aparición espontánea de mutantes se produce por diversas vías, incluyendo errores en la replicación de los ácidos nucleicos. Estos errores en la replicación del DNA cromosomal en eucariotas ha sido estimado para una gran variedad de genes y pseudogenes, y en general se considera que la tasa de sustitución por nucleótido en genes funcionales promedia sólo 10^{-9} cambios de nucleótidos por sitio y por año (1-4). Esta baja tasa de sustitución contrasta con la observada para virus animales y vegetales cuyo genoma está compuesto por RNA (5,6).

Estudios utilizando el bacteriofago QB, cuyo genoma está compuesto por una cadena de RNA, permitieron cuantificar el nivel de error por duplicación genómica, estimándose que se encuentra entre 10^{-3} y 10^{-4} cambios por nucleótido en una posición determinada. No obstante esta alta tasa de mutación el bacteriofago QB salvaje predomina en equilibrio con mutantes debido a que replica más rápidamente (7-9).

Como puede deducirse de lo anteriormente enunciado la tasa de sustitución de nucleótidos en virus a RNA es millones de veces mayor que la observada para el DNA cromosómico de los eucariotas que les sirven de huéspedes. Esto implica que muchas veces los huéspedes requieran eras geológicas para evolucionar, mientras que sus virus a RNA solo requieren cortos lapsos. Este hecho permite tomar a los virus a RNA como un modelo muy interesante para el estudio de la evolución, pero por otro lado entraña importantes implicaciones en la evolución de enfermedades sumamente peligrosas para los animales, vegetales y por supuesto para el hombre.

1.2. SOBRE EL MECANISMO DE LA ALTA FRECUENCIA DE MUTACIÓN DE LOS VIRUS A RNA.

Los errores en la replicación del DNA cromosomal varían considerablemente, promediando un valor que oscila entre 10^{-8} y 10^{-11} por nucleótido incorporado. Este bajo coeficiente de error se debe probablemente a la existencia de un sistema de fidelidad en la replicación, en el que intervendrían i) exonucleasas que remueven bases mal incorporadas durante la síntesis de nuevas cadenas de DNA (10-12), y ii) la selección de nucleótidos trifosfato correctos debido a la alta discriminación que poseen las DNA polimerasas por nucleótidos cuyos anillos de azúcar se encuentran alterados (12-15). Es por ello que las DNA polimerasas pueden controlar la producción de mutaciones puntuales influenciando la selección de trifosfatos correctos durante la polimerización y removiendo las bases incorrectamente insertadas en el extremo 3' de las cadenas crecientes, mediante la actividad exonucleolítica 3'-5' asociada con las mismas (16,17). Estudios utilizando la DNA polimerasa purificada del bacteriofago T4 evidencian ambos roles en mutagenesis, debido a que enzimas derivadas de cepas con fenotipo mutador y antimutador exhiben cambios en la selección de bases y en los niveles de actividad de las exonucleasas (17-19). También las DNA polimerasas de mamíferos controlan la frecuencia de mutación por estos mismos mecanismos (20,21). Estudios utilizando virus Herpes simplex 1 resistentes a seis drogas distintas demostraron que los mismos poseían un fenotipo antimutador, pues produjeron un menor número de mutantes resistentes a iododeoxicitidina que las que se obtuvieron de la progenie de la cepa salvaje. Este fenotipo antimutador fue localizado utilizando técnicas de genética y biología molecular en la DNA polimerasa. Esto sugiere que la mayor frecuencia de mutación de la cepa salvaje provee una ventaja selectiva durante la infección en animales y humanos (22).

En contraste con lo antes enunciado existen obvias explicaciones para las altas frecuencias de mutación observadas en los virus a RNA: i) No ha sido encontrado un sistema

enzimático de fidelidad de lectura asociado con las RNA polimerasas virales, y ii) La tasa de error intrínseca de las RNA polimerasas es muy alta (23).

Aparentemente los virus a RNA más grandes podrían haber desarrollado un sistema de prueba de lectura. el hecho de no haberlo encontrado llevaría a pensar que es evolutivamente desventajoso. Por lo tanto es probable que la alta frecuencia de error, con la concomitante plasticidad genética que genera, constituye una ventaja crucial para los virus a RNA (24).

1.3. OTROS MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN A LA ALTA VARIABILIDAD DE LOS VIRUS A RNA.

Recientemente se ha demostrado la existencia de recombinación intratípica entre RNAs genómicos de picornavirus (25,26). También ha sido demostrada la recombinación intertípica entre las mitades 5' y 3' de los genomas de una cepa neurovirulenta del tipo 3 de poliovirus, y una cepa atenuada del tipo 1 (27).

Además fue posible construir virus recombinantes, utilizando técnicas de Ingeniería genética, a partir del cDNA infectivo de poliovirus. Inicialmente se obtuvo una cepa de virus recombinante entre las primeras bases del extremo 5' del cDNA de la cepa Mahoney de poliovirus tipo 1 y el resto del genoma de la cepa Lansing del tipo 2 (28), seguido luego por la construcción de recombinantes intratípicas construidas a partir de cDNA de las cepas Mahoney y Savin 1 de poliovirus tipo 1 (29), y recombinantes intertípicas entre las cepas Mahoney de poliovirus tipo 1 y Lansing de poliovirus tipo 2 (30). Esto demuestra que entre los picornavirus este es un fenómeno ampliamente difundido.

En el virus de la influenza se comprobó que por recombinación intra o intermolecular se generó el genoma de una partícula defectiva interferente (DI) "mosaico" (31). Esto indica que la recombinación puede ocurrir en altas frecuencias, y no sería sorprendente encontrar recombinantes entre diferentes

tipos de RNAs virales o entre RNA genómico y RNA celular (289).

La contribución relativa de la recombinación en la variabilidad genómica de estos virus a RNA es muy difícil de estimar, debido a que la alta frecuencia de mutación tiende a enmascarar los eventos recombinatorios entre genomas similares durante la replicación

Otro de los fenómenos que colaboran en la variabilidad de los virus a RNA es el conocido reordenamiento de fragmentos genómicos, que ha sido demostrado en virus animales de genoma segmentado tales como los Arenavirus, Birnavirus, Bunyavirus, Reovirus, y especialmente estudiado en el virus de la influenza (32). Este mecanismo sería el causante de las pandemias ocurridas entre la población humana en 1957 cuando el subtipo H2N2 (influenza Asiática) reemplazó al subtipo H1N1 y también en 1968 cuando apareció el virus Hong Kong H3N2 (33).

1.4. SOBRE LA RÁPIDA EVOLUCIÓN DE LOS GENOMAS A RNA.

La característica de la rápida evolución de los organismos cuyos genomas están compuestos por RNA ha sido ampliamente estudiada (34).

La alta frecuencia de mutación analizada en los puntos anteriores no asegura necesariamente una alta frecuencia de evolución genómica. Muchas veces virus de fenotipo salvaje exhiben un alto grado de estabilidad al ser multiplicados varias veces en distintos laboratorios (35). Existe evidencia de la considerable estabilidad que presentan los virus a RNA bajo determinadas condiciones ambientales. Uno de los casos más remarcables es la reaparición del subtipo H1N1 del virus de la influenza tipo A en la población humana en el año 1977, cuya secuencia genómica es extremadamente similar al virus que había circulado en 1950 (36,37). Otro ejemplo es la comparación de virus vegetales aislados de herbarios de alrededor de 80 años de antigüedad con aislamientos recientes, demostrándose que no cambiaron, como era de suponerse, durante ese lapso de tiempo

(38).

Esta estabilidad genómica de los virus salvajes o mutantes se debe probablemente a la mayor capacidad de competir de ciertas variantes o grupos de variantes.

Domingo et al. (9) dedujeron que cada genoma viable en una población de bacteriofagos QB está mutado en uno o más sitios, cuando se los compara con la secuencia promedio de la cepa salvaje en esa población. No obstante esto, demostraron que mutantes con una frecuencia de replicación de 0,8 a 0,9 (menor que la de la "cepa salvaje") perdieron al competir con el virus tipo salvaje. Es por ello que las poblaciones (clonadas o no) de la mayor parte de los virus a RNA, no consisten en una especie genómica de secuencia definida, si no en una mezcla heterogénea de genomas relacionados, formando una "cuasiespecie" (39). Debido a la alta frecuencia de mutación, los genomas de una población viral comparten una secuencia consenso, pero difieren unos de otros (y de la secuencia consenso) en una, algunas o muchas mutaciones (40).

Esta definición probabilística del genoma de los virus a RNA es inevitable cuando el número de bases del genoma sobrepasa la recíproca de la frecuencia de mutación, pues por ejemplo si la frecuencia de mutación por nucleótido incorporado en las 8.000 bases del genoma del VFA es de alrededor de 10^{-4} , entonces toda progenie será diferente del genoma parental en por lo menos una base. Esto es cierto aunque se trate de una población viral salvaje previamente clonada cuyas características fenotípicas, mapas de oligonucleótidos, y secuencia genómica confirme sólo la presencia del fenotipo y la estructura genómica del tipo salvaje (24). Cuando este equilibrio se ve desbalanceado y la secuencia consenso del tipo salvaje (o mutante predominate) ya no prevalece, se crea una etapa de poca certeza hasta que vuelve a prevalecer una secuencia consenso diferente a la que fuera previamente definida. Es por todo ello que las condiciones que desequilibran el predominio de una variante determinada llevan a una extremadamente rápida evolución de los virus cuyos

genomas son a RNA.

Este fenómeno se evidencia tanto en la naturaleza como en el laboratorio. La rápida evolución en la naturaleza del virus de la influenza debido a mutaciones, como también a reordenamiento de los fragmentos genómicos, es un fenómeno ampliamente reconocido(32,33,41). Muchos virus pueden sufrir una rápida evolución durante los brotes en sus huéspedes naturales. Esto ha sido observado en brotes relacionados con la vacunación contra poliovirus, durante la diseminación desde Europa a Canadá y los Estados Unidos (42), como también en brotes de fiebre aftosa (43,44) y en enterovirus 70, causante de la conjuntivitis hemorrágica aguda, que comenzó en Ghana y se esparció por todo el mundo (45). En todos estos brotes de enfermedad la tasa de evolución de los genomas virales oscilaba entre el 0,1% y el 1% de sustitución de bases por año, es más, Kew et al. (46) observaron más de 100 cambios de bases en el genoma de las cepas vacunales de poliovirus durante su replicación en uno o dos humanos.

En estudios de laboratorio en los cuales se infectaron cultivos de células animales con virus a RNA clonados, se observó una rápida evolución o una relativa estabilidad de los genomas virales, dependiendo del virus, las células, las condiciones de los pasajes, etc. (47-52). Pringle et al. (53) describieron una mutante temperatura sensible del virus de la estomatitis vesicular que poseía una alta tasa de mutabilidad (fenotipo mutador), y Flamand (54) observó un aumento en la tasa de mutación cuando el virus de la estomatitis vesicular, multiplicado previamente a 30°C, fue pasado a 39,3°C. Por lo tanto el huésped el virus, y las diferencias ambientales pueden afectar las frecuencias de mutación y evolución en los virus a RNA.

1.5. FACTORES QUE PROMUEVEN EL DESEQUILIBRIO EN LAS POBLACIONES DE RNA GENÓMICOS.

En teoría, cualquier factor capaz de alterar el equilibrio en el que una variante o grupo de variantes dominan en una población viral determinada provocará una rápida evolución del genoma. A continuación describiré algunos de estos factores. En primer lugar el papel que juegan las partículas defectivas interferentes (DI) favorece la rápida evolución de los genomas a RNA, pues promueven un constante y pronto desequilibrio. Esto se debe a un proceso de selección intracelular, ejercido directamente sobre aquellos genes virales involucrados en los errores de replicación, relacionados con la iniciación de la replicación, la encapsidación, etc.

El alto grado de interferencia intracelular promueve la selección de mutantes que escapan a dicha interferencia. En VSV las partículas DI interfieren con el virus que las generó debido a que comparten los mismos sitios que utiliza la replicasa viral para iniciar la replicación del RNA. Estos sitios se encuentran en los extremos 3' de las cadenas de polaridad positiva (+RNA) y negativa (-RNA) del RNA de la partícula DI (que son similares al extremo 3' del RNA de polaridad positiva del virus). Se ha comprobado que los extremos 3' antes mencionados, que derivan del extremo 5' del (-)RNA encontrado en los viriones (55-60), varían más durante las infecciones persistentes que la región en el otro extremo de la molécula de RNA genómico (61).

Una vez que el equilibrio de una población viral es desbalanceado por partículas DI, mutantes interferentes, o cualquier otro mecanismo, las variantes presentes en la población viral ven afectada su capacidad competitiva, produciéndose un nuevo equilibrio en el cual dominarán aquellas mutantes cuyos cambios (en cualquier parte del genoma) las hagan más competitivas.

Tanto los Alfavirus como los Arenavirus (62) son capaces

de producir mutantes resistentes a las partículas DI en infecciones persistentes. Este fenómeno probablemente común entre los virus a RNA, es posiblemente un factor preponderante en la generación de diversidad entre los genomas a RNA.

Otro factor que contribuye con la aparición de variantes es la infección persistente, en donde se ha demostrado que la evolución de mutantes condicionales o deleciones genómicas está relacionada con el mantenimiento del estado de portador (34,64). También la célula huésped juega un papel importante permitiendo el establecimiento de infecciones persistentes, y evolucionando en forma paralela con los virus asociados a las mismas (65,66).

El efecto del sistema inmune en la aparición de nuevas variantes del virus de la influenza ha sido dividido en dos fenómenos conocidos como: i) salto antigénico y ii) deriva antigénica. El primero se produce por el reordenamiento de las neuraminidasas y hemaglutininas (proteínas de la envoltura) provocando un cambio antigénico brusco (32). En cambio la deriva antigénica se produce por la variación gradual de los genes estructurales o no estructurales, debido a mutaciones puntuales, pequeñas deleciones y/o inserciones (67). Estos cambios son menos obvios en otros virus a RNA, debido a que los serotipos no cambian tan rápidamente como en el virus de la influenza.

En general la región involucrada con la neutralización viral muta y evoluciona más rápidamente que otros componentes internos, sugiriendo que son las fuerzas selectivas inmunológicas las que dirigen preferencialmente la evolución.

Esta deriva antigénica ha sido ampliamente demostrada para el virus de la fiebre aftosa, en donde constantemente se producen variantes antigénicas (68,69), así como para muchos otros virus (70-72).

Holland et al. (73) observaron cambios en la reacción de anticuerpos contra mutantes de VSV recobradas después de años de infección persistente en cultivos de células y en ausencia de anticuerpos. Esto indica que la deriva antigénica no necesita de la presión selectiva del sistema inmune. Recientemente se

ha reportado que en el VFA existe una región genómica, cercana a la porción hiperveriable carboxiloterminale de la proteína inmunogénica VP1, que presenta una estructura secundaria generadora de variaciones antigénicas (74). La comprobación de que la evolución de la región antigénica hiperveriable no necesita de la presión inmunológica es uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral, para ello se ha elegido como generador de variabilidad a pasajes seriados por distintos sistemas celulares.

Tanto en infecciones persistentes, como en infecciones de corta duración, en las cuales se utilizan altas multiplicidades de infección, se promueven condiciones en donde la alta frecuencia de mutación (inherente a los genomas a RNA) desemboca en un alto grado de cambio. Una de las razones podría deberse a la acumulación de partículas DI (75) que llevan a un desequilibrio. Además, al infectar con un alto número de partículas una misma célula, se produce complementación intergenómica que influye la replicación y evolución. En casos extremos podrían propagarse mutaciones letales por complementación con otras no letales, hasta la aparición de nuevas mutaciones capaces de suprimir la letalidad.

Brand y Palese (76) observaron una rápida evolución genómica en el virus de la influenza en pasajes seriados diluidos, condiciones en las cuales VSV no muestra cambios rápidos. En células BHK21 tratadas con actinomicina D, donde se reduce la replicación de partículas DI, se observó la acumulación de mutantes ts (77). De aquí se deduce que en determinadas condiciones ciertas interacciones célula-virus promueven la rápida evolución de los genomas a RNA, mientras que en otros sistemas se mantiene un equilibrio estable.

1.6. ¿ES VENTAJOSA LA ALTA VARIABILIDAD PARA LOS GENOMAS A RNA?.

Uno de los problemas que enfrentan los genomas a RNA es la limitación en el tamaño de los mismos, ya que la probabilidad

que aparezcan errores letales durante la replicación es función del tamaño del genoma y de la frecuencia de error. Probablemente los virus a RNA podrían aumentar la fidelidad de replicación, sin embargo no lo han hecho, constituyendo una ventaja adaptativa. En cambio han limitado su tamaño genómico promedio a alrededor de 10.000 bases. Este tamaño es probablemente el óptimo que permite tener suficiente información genética acoplada con una alta frecuencia de error. Para los genomas segmentados el tamaño permitido, y/o la frecuencia de error pueden estar incrementadas un poco.

Una de las posibles ventajas de este sistema de poca fidelidad de replicación, inductora de una rápida evolución genómica, es sin lugar a duda la capacidad de escapar al sistema inmune de los huéspedes. Un ejemplo clásico son los constantes cambios antigénicos observables en el virus de la influenza en respuesta a la presión que ejerce el sistema inmune.

Los virus a RNA debido a su alta variabilidad son capaces de evolucionar sus genomas para poder replicarse en distintas células de sus huéspedes y vectores, permitiendo una transmisión regular entre los unos y los otros. Es por ello que este amplio y/o variable rango de especies huéspedes y tropismos en los tejidos de un huésped determinado inducen desequilibrios en las poblaciones de genomas a RNA, provocando la selección de variantes más adecuadas para los nuevos huéspedes. Probablemente es debido a esto que los virus capaces de replicar en insectos y mamíferos, o insectos y vegetales son en su mayoría a RNA y no a DNA. Se ha observado que cuando el VSV infecta moscas de la fruta (78) o cultivos de células de las mismas (79), se produce una rápida selección de nuevas mutantes.

El gran número y diversidad de huéspedes que tienen los virus a RNA que infectan plantas y animales, permite afirmar que estos son más exitosos que los virus a DNA. Esto no es cierto para los virus que infectan huéspedes procariontes, pues aparentemente los más abundantes y exitosos son a DNA, probablemente debido a que enfrentan menor complejidad que en el mundo Eucariota (24).

1.7. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PICORNAVIRUS.

La familia Picornaviridae, como su nombre lo indica (pico: muy pequeño, rna: ácido ribonucleico), está formada por pequeños virus cuyo genoma está compuesto por una sola hebra de RNA de polaridad positiva, que actúa como mensajero y es infectiva (80,81).

Los picornavirus son importantes patógenos para el hombre y los animales. El VFA, poliovirus, el virus de la hepatitis A, y también los rinovirus humanos (causantes principales de los resfriados comunes en el hombre) forman parte de esta familia.

Debido a su importancia económica y médica, el estudio de estos virus contribuyó prominentemente en el desarrollo de la virología moderna.

Micrografías electrónicas de viriones purificados o células infectadas revelan partículas de 23 nm a 30 nm de diámetro, con un core denso de 16 nm. Por tinción negativa es posible observar una estructura compuesta por subunidades, cuya simetría es icosaédrica. La partícula viral es resistente a solventes de lípidos, por lo tanto no posee envoltura.

Estudios sobre la biología molecular de estos virus demostraron la presencia de la primera RNA-polimerasa RNA-dependiente (denominada replicasa) (82), la existencia de una estructura de doble cadena relacionada con la replicación (83), y el descubrimiento de que poliovirus sintetiza sus productos genéticos clivando proteolíticamente una poliproteína (84).

La familia se divide corrientemente en cuatro géneros: Enterovirus, Cardiovirus, Rinovirus, y Aftovirus. Los miembros de esta familia son indistinguibles por microscopía electrónica. En la tabla 1 se enumeran los serotipos y miembros de cada uno de los géneros.

Los Enterovirus, denominados así pues la mayoría se encuentran en el tracto alimentario, incluye a poliovirus que es uno de los virus más estudiados de la familia.

Los Cardiovirus pertenecen todos a un solo serotipo, y

Tabla 1. Los Picornaviridae.*

Género	Número de serotipos	Miembros
Enterovirus	3	Poliovirus humano 1-3
	23	Coxsackie virus A1-22, 24 (A23=echovirus 9)
	6	Coxsackie virus humanos B1-6 (B5 muy similar a enfermedad vesicular de los porcinos) (95)
	32	Echovirus humanos 1-9, 11-27, 29-34; echo10 = reovirus tipo1 echo 28 = rinovirus 1A humano
	4	Enterovirus humanos 68-71
	1	Virus de la hepatitis A (enterovirus humano 72)
	1	Virus de Vilyuisk
	18	Enterovirus de simios 1-18
		Enterovirus bovino 1-7
	11	Enterovirus porcino 1-11
1	Poliovirus murino (Virus de Theiler TO, FA, GD7)	
Cardiovirus	1	Virus de la encefalomiocarditis (EMC), mengovirus, virus de Maus Elberfeld (ME), Columbia SK, MM.
Rinovirus	113?	Rinovirus humano 1-89
	2	Rinovirus bovino 1-2
Aftovirus	7	Virus de la fiebre aftosa (VFA) 1-7(serotipos A,C,O,SAT1-3,Asia1).
No asignado	>3	Rinovirus equino 1,2, virus de la parálisis de los grillos, virus de la drosophila C, etc.

	>231	

*: Tomado de Virology(1985). Fields, B. N. et al. (ed.), Raven Press, New York, capítulo 32, p. 706.

probablemente sean cepas del virus de la encefalomiocarditis (EMC). Son generalmente considerados como virus murinos, pero su rango de huéspedes incluyen al hombre, cerdos y elefantes entre otros.

Los Rinovirus denominados así por su especial adaptación a la región nasofaríngea, son los agentes etiológicos del resfriado común en niños y adultos (85-87). Oficialmente existen 89 serotipos (88), pero los actuales candidatos hacen que este número exceda los 113 (89).

Los Aftovirus infectan a animales de pezuña hendida, como ser vacunos, porcinos, caprinos, etc. Dentro de sus 7 serotipos por lo menos 53 subtipos han sido identificados por fijación de complemento.

A algunos virus como los rinovirus equinos 1 y 2 (90,91), y a un grupo de picornavirus de insectos (92-94) no se les ha asignado género.

Las características más sobresalientes de los representantes de cada género se encuentran en la tabla 2.

1.8. LA FIEBRE AFTOSA.

1.8.1 Breve reseña histórica.

El VFA, sin lugar a dudas el agente patógeno más importante del ganado, fue el primer virus animal reconocido cuando Loeffler y Frosch en 1898 (96) descubrieron que el agente causal de la fiebre aftosa pasaba a través del filtro de Berkfeld, y por lo tanto era mucho más pequeño que otros microorganismos conocidos hasta el momento como transmisores de enfermedades.

Uno de los primeros registros científicos de la enfermedad fue el realizado por Fracastorius en 1514, cuando describió las características de un brote de una enfermedad en bovinos, los cuales coinciden con las descripciones actuales de la enfermedad. Los animales rehusaban alimentarse y el interior de la boca se encontraba enrojecido y con vescículas que,

Tabla 2. Características de los 4 géneros de los Picornaviridae.

Característica	Género			
	Enterovirus	Cardiovirus	Rinovirus	Aftovirus
Virus tipo	poliovirus	EMC	rinovirus14	VFA
Estabilidad pH	estable 3-9	estable3-9	labil<6	labil<7
Densidad de flotación viriones	1,34	1,34	1,39-1,42	1,43-1,45
Densidad de flotación cápside	1,30	1,30	1,29	1.30
Coefficiente de sedimentación	156S	156S	149S	142-146S
Longitud en N° bases genoma	7.433	7.840	7.209	8.450
Longitud promedio poli (A)	62	35	74	100
Peso molecular genoma	$2,58 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,74 \times 10^6$
N° aminoácidos de VPg	22	20	23	23,24
Presencia de poli (C)	no	si	no	si
N° de aminoácidos de poliproteína	2.207	2.290	2.178	2.332

posteriormente, descendieron a las patas. La mayoría de los animales que mostraron esos síntomas se recuperaron. El contagio difundido desde la provincia de Friaul hacia el distrito de Euganean y posteriormente hasta Verona, fue diseminado por el aire, aunque otros medios tales como el agua y fangales no fueron excluidos (97).

A la República Argentina habría llegado desde Europa durante la segunda mitad del siglo pasado, mediante la importación de ganado infectado.

1.8.2 La enfermedad. Su distribución geográfica.

La fiebre aftosa es una enfermedad vesicular de origen viral altamente contagiosa para animales herbívoros de pezuña hendida. Los animales biungulados afectados por esta enfermedad tales como bovinos, porcinos, ovinos, y caprinos, son muy importantes para la actividad económicas del hombre. Su elevada infecciosidad, facilidad con la cual el virus se disemina, su amplia distribución y el gran número de serotipos, constituyen algunas de las características que dificultan el control de la enfermedad.

Esta enfermedad se caracteriza por la formación de vesículas en las mucosas de la boca, nariz, espacios interdigitales, y epitelio de los pezones (98). Las lesiones en la boca impiden que el animal pueda alimentarse, y las que se producen en la patas, que normalmente son invadidas por bacterias, provocan renguera. Como consecuencia de ello los animales pierden peso y producen menos leche.

Presenta una alta morbilidad, y una baja mortalidad que está asociada con animales jóvenes (99). Sin embargo las mayores pérdidas se deben a la imposibilidad de vender carnes a países que están libres de la enfermedad, sobre todo actualmente que con la vacunación en nuestro país se ha logrado mantener la incidencia de la enfermedad en bajos niveles, limitados a brotes que pueden ser controlados.

Uno de los principales problemas de esta enfermedad es que animales que sufrieron la infección por un serotipo determinado no quedan protegidos contra los otros serotipos. Además los animales pueden ser reinfectados por variantes antigénicas del mismo serotipo. Inicialmente los VFA fueron agrupados de acuerdo a la capacidad de producir protección cruzada en animales, pero más recientemente se los ha agrupado tomando en cuenta la prueba de fijación de complemento (100,101). Se han distinguido 7 serotipos (A, C, O, SAT 1, SAT 2, SAT 3, ASIA 1). Dentro de cada serotipo existen variantes antigénicas que presentan diferencias en pruebas de neutralización o fallan en proteger a animales de serotipos semejantes, siendo denominados como subtipos.

Existen más de 60 subtipos, muchos de los cuales prácticamente no protegen contra la infección con subtipos del mismo serotipo. Nuevos subtipos aparecen constantemente en ganado de áreas endémicas debido al proceso de deriva genética analizado en el punto 1.4 a 1.6, y esto provoca que se tomen cuidados extremos en la selección de las cepas utilizadas para vacunación.

Existe una amplia distribución geográfica de la enfermedad. En la tabla 3 pueden observarse cuales son los serotipos predominantes en distintos lugares del mundo (102). Los países en donde la enfermedad está presente se ven expuestos a severas restricciones de exportación, pues no son aceptadas sus carnes y productos lácteos en países libres de la enfermedad.

En los Estados Unidos de Norteamérica se registró el último brote en 1929, en Canada en 1952, y en Mexico se erradicó en 1953. En Australia la última denuncia data de 1872 cuando una enfermedad en bovinos, semejante a la fiebre aftosa, fue erradicada sacrificando a los animales infectados. En Japón no se registran brotes desde 1908, mientras que los países escandinavos se consideran libres de la enfermedad desde 1952. En Chile ha sido posible erradicarla recientemente.

La enfermedad nunca fue detectada en Nueva Zelandia, Centroamérica, Islas del Caribe y la Polinesia.

Tabla 3. Distribución geográfica de los serotipos y subtipos del VFA.

Serotipo	Nº de subtipos	Distribución de serotipos
A	≥29	África, Europa, Medio Oriente, Sudamérica, Asia.
	≥10	África, Europa, Medio Oriente, Sudamérica.
C	≥5	África, Europa Occidental, Medio Oriente, Sudamérica, Asia.
SAT 1	≥7	África, Medio Oriente.
SAT 2	≥3	África.
SAT 3	≥4	África.
ASIA 1	≥3	Asia, Medio Oriente.

En los otros países Europeos tales como Francia, Alemania, Inglaterra e Italia, la enfermedad se encuentra completamente controlada, y se la considera en vías de desaparición,

En la Argentina la enfermedad es endémica, pero existe una zona libre al sur del Río Colorado.

1.8.3 Inmunología y control de la enfermedad.

Los bovinos que se recobran después de la infección con un tipo de VFA, se encuentra generalmente inmunizado contra la exposición natural al mismo serotipo por 1 a 3 años (98). Si se los inocula intradermolingualmente luego de unos pocos meses de ocurrida la enfermedad, con un virus homólogo, se producirán vesículas primarias que no llegaran a generalizar la infección. La duración de la inmunidad en cerdos es menor que en bovinos.

Los porcinos y bovinos recién nacidos de madres vacunadas no poseen anticuerpos, pero los adquieren rapidamente al ingerir calostro (103,104). Esta protección dura entre 2 y 4 meses de edad (105).

Sueros de animales convalescientes o hiperinmunes protegen al ganado no expuesto por 10 a 14 días (98), pero grandes dosis son requeridas, lo que provoca que sea antieconómico.

Los métodos utilizados en el control de la fiebre aftosa varían de país en país. Si en los países en donde la enfermedad no existe se introduce el VFA, se la erradica sacrificando los animales infectados y expuestos, y en algunos casos se vacuna hasta que la enfermedad se deja de detectar. En otros países donde se producen brotes esporádicos, se adoptan programas de vacunación que reducen la incidencia de la enfermedad. En los países donde la fiebre aftosa es endémica se vacuna regularmente con cepas actuantes (69).

Las vacunas contra el VFA se producen creciendo virus en cultivo de tejidos o en epitelio lingual bovino, e inactivandolo con formaldehido o acetiletlenimina. Sin embargo vacunas con virus atenuados han sido utilizadas con magros resultados, espe-

cialmente debido a la poca protección cruzada obtenida, a que la atenuación no es para todo el rango de huéspedes, y a la gran facilidad con que revierten (69,106,107).

La duración de la inmunidad conferida por la vacuna inactivada depende del adyuvante utilizado. Cuando se utiliza hidróxido de aluminio y saponina se obtienen buenos niveles de protección por 3 meses, en cambio con adyuvantes oleosos la duración es mayor, observándose protección durante más de 6 meses (108).

Estas vacunas que utilizan partículas virales, si bien producen altos niveles de respuesta y protección por tratarse de una partícula muy antigénica, requieren refrigeración y tienen una limitada vida media. Escapes del virus de los laboratorios de producción de vacunas presenta un riesgo para el ganado que se haya en las cercanías. La incompleta inactivación viral ha sido relacionada con brotes de la enfermedad (109,44) que causaron estragos económicos. Es por todo ello que en países donde el control de la enfermedad es efectivo, el riesgo de contraer la enfermedad por infecciones relacionadas con la vacunación es tan alto como la de contraer la enfermedad naturalmente.

Una de las proteínas de la cápside del VFA, designada VP1, al ser utilizada como vacuna, demostró ser antigénica induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes (110,111) que protegieron a bovinos y porcinos contra la infección viral (112,113). Además, algunos fragmentos generados por clivajes con bromuro de cianógeno y proteasas de la región carboxilo terminal de VP1 demostraron ser activos, indicando que porciones discretas de esta proteína contienen los epitopes responsables del efecto de inmunización (113,114,115).

Como vacuna, VP1 purificada a partir de virus tiene ciertas desventajas, entre ellas: i) las cantidades de VP1 requeridas para inmunizar son mucho mayores que las necesarias al utilizar viriones completos, ii) la purificación de VP1 es tediosa, iii) se necesita obtener virus para obtener VP1, lo que provoca riesgos

de escape del virus de los laboratorios. Sin embargo la vacunación con VP1 presenta ventajas, como ser i) la no infecciosidad de la subunidad, ii) estabilidad al calor, iii) puede ser almacenada indefinidamente. Muchas de las desventajas antes enunciadas pueden ser eliminadas si se produce VP1 en bacterias utilizando técnicas de DNA recombinante (116,117,118). La protección con esta "VP1 recombinante" es varios órdenes de magnitud menor que la obtenida con la partícula viral entera, pero es semejante a la respuesta cuando se utiliza VP1 aislada de viriones.

Otro tipo de aproximación muy promisorio al problema de la búsqueda de vacunas no convencionales para resolver el problema que presenta el VFA, es la utilización de péptidos sintéticos correspondientes a la región carboxiloterminale de VP1. Se ha determinado que en la región carboxilo terminal de VP1 existen tres zonas relacionadas con la neutralización: i) entre los aminoácidos 140 y 160 (113,119,120), ii) entre los aminoácidos 160 y 180 (120), y iii) entre los aminoácidos 200 y 213 (120,121). Estos péptidos unidos a proteínas carrier han inducido anticuerpos neutralizantes en animales de laboratorio y bovinos (122,123,124). Recientemente se han obtenido interesantes niveles de protección utilizando péptidos sintéticos correspondientes a las regiones antes mencionadas unidos en serie, y sin necesidad de acoplarles proteínas carrier (126).

1.8.4 El RNA viral y sus productos genéticos.

El genoma del VFA, como el de los otros picornavirus, está compuesto por una sola molécula de RNA que actúa como mensajero. El extremo 3' se encuentra poliadenilado (127), y en el extremo 5' presenta una pequeña proteína covalentemente unida (128,129) denominada VPg. Tanto el genoma del VFA como el del EMC poseen un poli (C) de aproximadamente 100 a 150 bases, ubicado entre VPg y el comienzo de la región que codifica para las proteínas virales (130,131,132).

La longitud del poli (A) del extremo 3' es variable, y no se elimina por purificación en placa de los stock virales. Normalmente tiene un promedio genéticamente determinado, que varía entre 35 (en EMC) y 100 bases (en VFA). La remoción del poli (A) mediante el uso de RNasa H reduce la infectividad del RNA de poliovirus, poniendo de manifiesto que el poli (A) cumple una importante función (133). La función no es clara, pero las moléculas con un poli (A) corto tienen menor infectividad específica (134). Las cadenas de RNA de polaridad negativa encontradas en los intermediarios replicativos contienen un poli (U) en el extremo 5', de similar longitud y heterogeneidad que el poli (A) (135), indicando que el extremo 3' se encuentra genéticamente codificado. No obstante esto existe evidencia de que puede elongarse postranscripcionalmente (134).

La proteína VPg se encuentra covalentemente unida al extremo 5' de las cadenas de RNA de polaridad positiva y negativa, a través de un pUpUp del RNA enlazado por un puente fosfodiéster a un grupo hidroxilo (O^4) fenólico de un residuo de tirosina (136). La secuencia genómica del VFA predice tres genes en serie para VPg (137), habiéndose observado previamente en el RNA viral tres formas distintas de la proteína (138). Se ha sugerido que VPg juega un papel importante en el empaquetamiento del RNA en los viriones, pues no se encuentra presente en las moléculas que sirven como mensajero y también que juega algún papel en la iniciación de la síntesis del RNA viral (ver 1.8.6).

El poli (C) se encuentra en la región 5' que no codifica para proteínas, a unas 400 bases del extremo, y antes del codón de iniciación para la traducción (139,140,141). La longitud del poli (C) es homogénea dentro de un mismo aislamiento viral, pero difiere entre distintas cepas; esta variación en la longitud no ha podido ser correlacionada con función biológica alguna (106,139,142), es más, se desconoce cual puede ser el papel del mismo en la biología del virus.

El poli (C) divide al genoma en una región S (por "small") y otra L (por "large") (132). El fragmento S, que compone parte

de la región 5' que no codifica para proteínas, ha sido recientemente secuenciado (141). La traducción "in vitro" del fragmento L, que comienza 700 bases antes del codón de iniciación de la traducción, produce el mismo espectro de proteínas que el RNA de longitud total, en cambio el fragmento S no produce proteínas (143). Esto sugiere que el fragmento S no tiene función de codificar proteínas.

El RNA genómico contiene un marco largo de lectura que codifica para un polipéptido grande de 250 kilodaltons, denominado poliproteína. Esta proteína, correspondiente a la totalidad del mensaje, normalmente no alcanza a formarse pues es clivada durante la traducción. Inicialmente se forman 4 productos que son utilizados para definir las 4 regiones funcionales del genoma, y que son semejantes a las delineadas para poliovirus (145) y para EMC (146). Para el VFA estas 4 regiones son las siguientes (147): i) la región L, ubicada en el extremo 5' de los componentes de la cápside, que codifica para un polipéptido líder (P16-L), ii) una región P1 que codifica para los polipéptidos de la cápside (P91), iii) una región P2 que codifica para el precursor (P56) de polipéptidos correspondientes a la región del medio del genoma, y por último iv) la región P3 que codifica para el precursor (P102) que incluye a las tres moléculas de VPg (148), la proteasa viral (149,150) y la polimerasa viral (151,152).

En la figura 1 se encuentra la nomenclatura correspondiente al mapa de clivaje de la poliproteína adoptado en 1983 por el Grupo de Estudio Europeo sobre la Biología Molecular de los Picornavirus (153), y en la tabla 4 se compara esta nueva nomenclatura con la utilizada previamente para los distintos géneros de la familia.

Los segmentos 1A, 1B, 1C y 1D de la región P1 son los elementos que constituyen las subunidades (protómeros) de la cápside. El producto 3C es la proteasa que cataliza el clivaje de muchos, pero no todos, los sitios de la poliproteína. El péptido 3B es VPg, mientras que el producto 3D corresponde a la enzima capaz de elongar las cadenas nacientes originadas en el templado de

Figura 1. Estructura del genoma de los picornavirus y mapa de clivaje de las proteínas virales.

El poli (C) (...) se encuentra en dirección 5' de la proteína L, está presente en el VFA y los cardiovirus. La poliproteína del VFA contiene tres polipéptidos 3B (VPg), mientras que la de los otros picornavirus solo poseen uno. g^r representa al marcador genético de resistencia a guanidina. La nomenclatura de las proteínas es la adoptada en 1983 por el "European Study Group on Molecular Biology of Picornaviruses" (153).

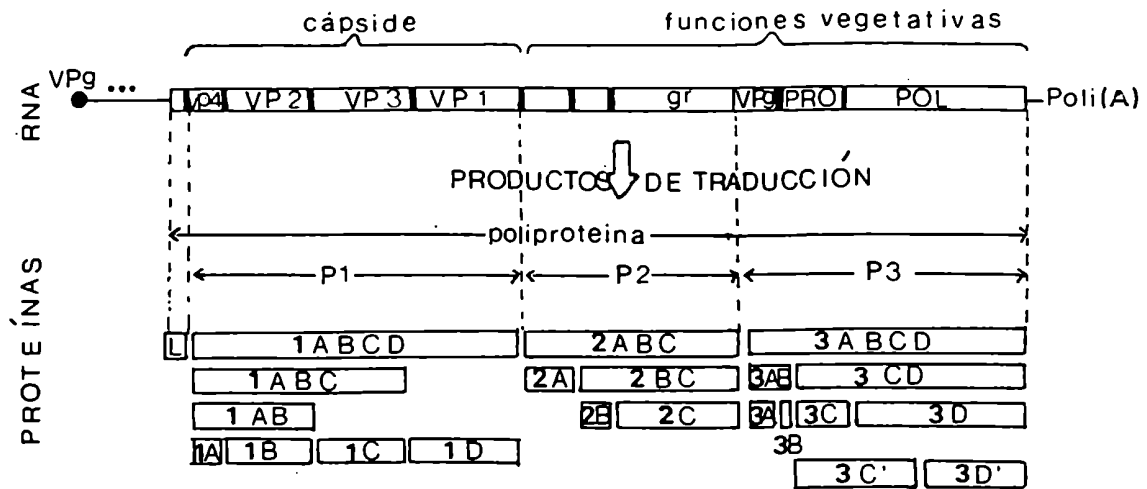


Tabla 4. Nomenclatura de la proteínas de los picornavirus.

Nombre	Polio		VFA		HRV-2	EMC
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
L434						
L		p16	p16/20			p12/14
L-1-2A						pre-A
1-2A						A
1 ó P1	1a	P1-1a	p91	p88	1A	B
2 ó P2	3b	P2-3b			5S	
2BC	5b	p2-5b			X(43)	
2A	8	p2-8	p14	p20c		G
2B	10	p2-10				I
2C	X	P2-X	p41	p34	38	F
2AB	7a	P2-71				
3 ó P3	1b	P3-1b	p102	p100	1B	C
3AB	9	P3-9	p19	p14		H
3C	7c	P3-7c	p18	p20b	7c	p22
3D*	4	P3-4b	p56	p56a		E
1A	VP4	VP4	VP4	VP4	VP4	alfa
1B	VP2	VP2	VP2	VP2	VP2	beta
1C	VP3	VP3	VP3	VP3	VP3	gama
1D	VP1	VP1	VP1#	VP1	VP1	delta
1AB	VP0	VP0	VP0	VP0	VP0	epsilon

(1): Pallansch et al. (171); (2): Kitamura et al. (144); Grubman et al. (172); (4): Doel et al. (150); (5): Yin and Lomax (173); (6): Rueckert (174).

*: también conocida como NCVp4, p63, Poli (U) polimerasa, replicasa o RNA polimerasa.

#: anteriormente conocida como VP3 (113).

RNA.

La proteína 3CD de poliovirus y de los rinovirus humanos puede ser clivada en dos formas diferentes para dar los polipéptidos 3C+3D o 3C'+3D' (154,150). Este clivaje alternativo ha sido reportado en células infectadas con VFA (156) pero parece no producirse en células infectadas con cardiovirus (157,158). En poliovirus el clivaje que origina la polimerasa y la proteasa activas se produce entre los aminoácidos glutamina-glicina (159), y por ende es producido por la proteasa 3C, mientras que el clivaje alternativo se produce entre tirosina y glicina, indicando probablemente la acción de una proteasa de origen celular (160), siendo poco clara la función biológica de este clivaje.

Las funciones de las proteínas de la región P2 están poco definidas, pero ha sido sugerido que 2C estaría involucrada en la síntesis de RNA, mientras que 2B determinaría el rango de huéspedes. Además en 2C se encuentra el marcador genético para la resistencia a la guanidina, tanto para el VFA (161), como para poliovirus (162).

El clonado molecular de distintas cepas del VFA (116,117,163, 164,165,166,147), como también la secuenciación de las proteínas (167,168,169), y la obtención de anticuerpos contra las distintas proteínas virales producidas en bacterias que expresan el cDNA del VFA (170), permitieron establecer los sitios de clivaje de las proteínas virales (tabla 5). Como puede apreciarse existe poca homología en el clivaje de la poliproteína del VFA, cosa que no sucede en poliovirus y EMC. Aparentemente existiría un reconocimiento por el ácido glutámico o glutamina seguido de glicina, serina o treonina, semejante a lo que sucede en poliovirus y EMC con el par glutamina-glicina. Además en el VFA existiría un segundo reconocimiento por lisina-glutamina-leucina-leucina(clivaje)asparragina, o lisina-glutamina(clivaje)leucina, o lisina-glutamina (clivaje)isoleucina. Estas tres últimas secuencias relacionadas entre si se encuentran entre los bordes y dentro de la región P2. Actualmente existe evidencia que sostiene

Tabla 5. Productos de clivaje primario y secundario, y sitios que generan los polipéptidos funcionales a partir de la poliproteína en el VFA.

Región genómica	Productos primarios de clivaje	Polipéptidos funcionales	Clivaje de la proteasa
L	P16-L		Gly/Gln ó Gln.Ser. Gly/Asn
P1	P91-VP4/3/2/1	VP4 VP2 VP3 VP1	Ala/Asp Val/Gly Gln/Thr Lys.Gln.Leu.Leu/Asp (Arg/Pro)
X?			
P2	P56-2A/C	P14-2A P41-2C	Lys.Gln/Leu Lys.Gln/Ile
P3	P102-3A/VPg/C/POL	P19-3A VPg1-3B VPg2-3B VPg3-3B P18-3C P56a-3D	Glu/Gly Glu/Gly Glu/Gly Glu/Ser.Gly Glu/Gly (carboxilo terminal)

(/): indica clivaje primario y secundario.

X?: péptido de 16 aminoácidos no presente en VP1 ni en P56-2A/C.

que el clivaje se produciría por proteasas virales o de la célula huésped.

Además de la existencia de 3 moléculas distintas de VPg y de la heterogeneidad en el reconocimiento de las secuencias de clivaje de la poliproteína, la otra particularidad en el genoma del VFA es la existencia de dos sitios alternativos de iniciación en la traducción de la poliproteína. Luego del poli (C), a aproximadamente 620 nucleótidos en dirección 3', se encuentran dos codones AUG que potencialmente funcionarían como puntos de iniciación de la poliproteína, a una distancia de 87 nucleótidos uno de otro. Probablemente la proteína P16-L se forma cuando la iniciación comienza en el segundo AUG, que codifica para una metionina acetilada. Este codón comparte las características propuestas por Kozak (170) para que se produzca una eficiente iniciación de la traducción (AXX AUG G). En el primer AUG se sintetizaría el líder alternativo P20a-L, que comparte secuencias con P16-L, pues es posible inmunoprecipitarlo con antisuero producido contra P16-L (166).

En la tabla 6 se encuentran sintetizadas las características principales de las distintas proteínas virales y sus precursores.

1.8.5 El virión.

La partícula viral es icosaédrica y presenta un diámetro de 22 nm (175).

Como el resto de los picornavirus la cápside viral está compuesta por 4 polipéptidos mayoritarios: VP1, VP2 y VP3 de semejante peso molecular y VP4 cuyo peso molecular es aproximadamente 3 veces menor (tablas 4,5 y 6). Por cápside encontramos 60 copias de cada una de estas proteínas y una a dos copias de VP0, precursor de VP2 y VP4 (176,177,165). El tamaño similar de VP1, VP2, y VP3 hacen dificultosa su separación en geles de SDS-poliacrilamida (176,178).

La organización básica de estas proteínas en la cápside

Tabla 6. Propiedades de los polipéptidos codificados por el VFA.

Nomenclatura L434	Número de aminoácidos	Masa Molar	Carga neta#	Función
Foliproteína	2.332	258.946,8	+37	precursor
LAB	217	24.367,4	-5	?
LB	189	21.243,1	-7	?
P1	720	79.305,6	+13	precursor
1A	69	7.362,3	-3	prot.cápside
1B	218	24.410,4	+4	prot.cápside
1C	220-	23.746,4	-2	prot.cápside
1D	213	23.840,5	+14	prot.cápside
P2	488	54.501,1	+8	precursor
2A	154	16.255,1	+2	?
2C	318	35.892,9	+8	:
P3	907	100.844,7	+21	precursor
3A	153	17.355,2	-5	?
3B	23	2.604,5	+3	VPg 1
3B	24	2.622,4	+4	VPg 2
3B	24	2.579,3	+3	VPg 3
3C	213	23.012,4	+9	proteasa
3D	470	52.760,9	+7	replicasa

#: diferencia entre aminoácidos cargados positivamente (Arg, His y Lys) y negativamente (Asp y Glu) según criterio seguido por Beck et al. (165).

icosaédrica fue dilucidada inicialmente para los cardiovirus. Cuando se trataron los viriones a pH 6 y 0,1 M de iones cloruro o bromuro, fue posible disociar termicamente a las partículas liberándose el RNA infeccioso, VP4 y 12 pentámeros, compuestos por cinco copias de VP1, VP2, y VP3 y en algunos casos VP0. Los pentámeros al ser tratados con 2M urea se disociaron en monómeros compuestos por (VP1,2,3). Es decir que la cápside viral se encuentra asociada por dos tipos de enlaces: i) uno que une a los 12 pentámeros que es ácido sensible, ii) el otro mantiene unidos a los pentámeros, que son urea sensibles, permitiendo que los monómeros (protómeros) se mantengan asociados de a 5 para establecer los pentámeros (179-181).

En el VFA se producen subunidades 12S (pentámeros) al disociar a los viriones con pH inferior a 6-6,5 ó a más de 56 °C. Estas partículas 12 S o pentámeros están compuestas por cantidades equimolares de VP1, VP2 y VP3 , que pueden ser disociadas a su vez en partículas 4S (monómeros) (175).

La proteína VP1 del VFA ha sido identificada como la portadora del epítipo antigénico más importante y como integrante del receptor involucrado en la adsorción a la célula huésped (182). Al tratar a la partícula viral con tripsina, se observa que no se adsorbe a células huéspedes, y que pierde la capacidad antigénica (182,183).

La estructura de la cápside ha sido ampliamente estudiada utilizando anticuerpos monoclonales (184-186), agentes capaces de marcar la superficie externa (187), e irradiación con luz ultravioleta (188,189). Mediante estas técnicas se ha podido establecer qué porciones de VP1, VP2, y VP3 se encuentran expuestas en el virión, mientras que VP4 estaría en la parte interna y relacionada con el RNA.

Recientemente se ha determinado la estructura tridimensional de poliovirus y de rinovirus humano 14 por medio de cristalografía de rayos X. Se encontró que la estructura es muy similar a la de muchos virus vegetales icosaédricos, y se estableció la forma, ubicación y relación entre las distintas

proteínas de la cápside (190,191).

1.8.6 Ciclo de multiplicación viral.

El acontecimiento inicial en la infección es la adsorción de los viriones al receptor celular específico ubicado en la membrana plasmática, seguido por la penetración de las partículas virales en el citoplasma. Este proceso de liberación del genoma viral al citoplasma celular mediado por el receptor es un mecanismo poco dilucidado, cuya consecuencia es la pérdida de VP4 y la liberación del RNA. En los cardiovirus y el VFA no se han detectado partículas sin VP4 probablemente debido a que son muy lábiles para sobrevivir (192,193).

Los mecanismos moleculares entre la adsorción y la iniciación de la traducción son muy difíciles de reproducir usando fracciones celulares, por lo tanto se utilizan métodos indirectos tales como microscopía electrónica (194) o la determinación de cambios estructurales en los viriones (195,196).

Se ha podido establecer que la penetración a través de la membrana plasmática se produce mediante el proceso denominado viropexis o fagocitosis, y que el desnudamiento del RNA viral es un mecanismo diferente para los enterovirus y los rinovirus (197,198) que para los cardiovirus y aftovirus.

El RNA viral liberado en el citoplasma se une a los ribosomas y otras proteínas de la maquinaria de síntesis proteica del huésped, formando polisomas que dirigen la síntesis de la poliproteína viral (ver punto 1.8.4).

La poliproteína es clivada mientras se sintetiza, para formar los precursores de la proteínas de la cápside (P1), las proteínas de la porción central del genoma (P2), y el precursor de las proteínas funcionales ubicadas en el extremo 3' del genoma (P3). Esta última se cliva autocatalíticamente

(199) produciendo tres proteínas menores: i) la proteasa responsable del clivaje de otras proteínas virales, ii) los precursores de VPg probablemente necesarios en la iniciación de la síntesis del RNA (200,201), y iii) la RNA-polimerasa RNA-dependiente capaz de copiar cadenas de polaridad negativa y de polaridad positiva (202 y sus referencias).

Los intermediarios replicativos, cuya función es amplificar el número de genomas virales, están compuestos por cadenas de (+)RNA y (-)RNA asociados al retículo endoplasmático liso (203). Algunos (+)RNA funcionan como mensajeros, mientras que otros son empaquetados en los viriones (ver 1.8.8). El RNA aislado de los polisomas (mRNA) no posee VPg (204,205), y es tan infectivo como el RNA de los viriones, por lo tanto VPg no es requerido para la infectividad (206). Además, se ha aislado de células Hela una enzima capaz de remover VPg del RNA de los viriones. La función celular de esta enzima es un misterio, pues no se han aislado proteínas tipo VPg en células no infectadas (207). Normalmente las partículas virales maduras son liberadas al medio debido a la desintegración celular promovida por la infección viral.

El tiempo requerido para un ciclo completo de infección generalmente varía entre 5 y 10 horas, dependiendo de variables tales como pH, temperatura, cepa de virus, tipo de huésped, estado nutricional de las células, y de la multiplicidad de infección (m.o.i.) (208). Durante la fase inicial del ciclo se produce un retardo denominado eclipse, en el cual la infectividad se debe al remanente del inóculo. En esta fase las partículas virales se encuentran en procesos de replicación tales como desnudamiento del RNA o síntesis de las proteínas virales, pero no en el ensamblaje de nuevos viriones. Este período dura entre 2 y 4 horas, y puede reducirse al aumentar la m.o.i. (208). Al eclipse sigue la fase exponencial, en donde la infectividad aumenta en forma constante. Finalmente se desacelera el aumento de la infectividad y se produce un máximo o "plateau", que normalmente continúa con la disminución de

la infectividad debido a la ruptura espontánea del RNA dentro de las partículas virales (209).

1.8.7 Efectos sobre la célula huésped.

La infección de los picornavirus generalmente causa cambios dramáticos en el metabolismo de las macromoléculas de la célula huésped (210).

La síntesis del RNA ribosomal y mensajero comienza a declinar enseguida después de la infección de muchos picornavirus tales como poliovirus, mengovirus, virus EMC, rinovirus humano y el VFA (211). Al mismo tiempo esto es acompañado por el dramático incremento del RNA viral.

En etapas tempranas de la infección se observa la inhibición en la síntesis de las proteínas celulares. En el caso de células Hela infectadas con poliovirus, que es el sistema más intensamente estudiado, la inhibición en la síntesis de proteínas celulares comienza media hora luego de la adsorción, penetración y desnudamiento del RNA. Llega a un máximo a las 2 horas, mientras que las proteínas virales producen un pico de síntesis a las 3 horas, para luego declinar con la muerte celular.

Durante la infección se produce un cambio en la morfología celular. Luego de 1 hora de infección es posible observar que el material nuclear pierde su textura homogénea, y se acumula alrededor de la membrana nuclear (210). Se han reportado alteraciones en la composición de las histonas en células infectadas con cardiovirus (212) o VFA (213).

La inhibición en la síntesis de RNA, DNA y proteínas celulares que se produce alrededor de la primera hora de infección, no es suficiente para justificar el marcado efecto citopático. Existen indicaciones indirectas de que es necesaria la expresión de las proteínas virales para que este efecto ocurra (214).

Uno de los puntos más intrigantes en la biología de los picornavirus es la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas celulares sin bloquear la síntesis de proteínas virales. El RNA de poliovirus, a diferencia de la mayoría de los mRNA celulares, no posee una estructura tipo "cap" $m^7G(5')ppp(5')N$ en su extremo 5', si no que termina en pUp (204). Esto llevó a investigar el mecanismo que pudiera inactivar a factores que se unieran al cap y que fueran indispensables para la traducción de los mRNA celulares, pero no para poliovirus. Recientemente fue posible establecer que la inhibición mediada por el virus es causada por la inactivación del complejo de unión al "cap", indispensable para que los mensajeros con "cap" se unan a los ribosomas (215). Además de comprobarse que este complejo es clivado en células infectadas por poliovirus (216), también se comprobó que no es la proteasa viral $3C^{Pro}$ la responsable del clivaje (217).

Un mecanismo similar al descrito para poliovirus también se observa en células Hela infectadas con rinovirus humano 14, pero no cuando se infecta con cardiovirus (211). Además la inhibición en la síntesis de proteínas de células L infectadas con EMC o mengovirus, se produciría por un mecanismo diferente, que probablemente se debería a la competición entre los mensajeros virales y celulares por factores involucrados en la iniciación de la traducción a los mRNA celulares (218).

Virtualmente no se han conducido estudios sobre la inhibición de la síntesis de proteínas celulares durante la infección de otros picornavirus, además de los descritos anteriormente, por lo tanto todavía no se ha aclarado cual es el mecanismo en el VFA.

1.8.8 Morfogénesis.

La morfogénesis en los picornavirus se puede definir como una cascada de tres o cuatro eventos en los cuales monómeros

compuestos por VP1,3,0 se convierten en pentámeros, estos a su vez se ensamblan constituyendo los proviriones compuestos por 12 pentámeros. No está claro si el RNA genómico se inserta antes o después del ensamblaje de la cápside. La etapa final en la cual se forman los viriones maduros involucra el clivaje de casi todas las moléculas de VP0, formando así la cápside compuesta de 60 subunidades, con un coeficiente de sedimentación de alrededor de 150 S. La clave de la existencia del clivaje de VP0 para formar la partícula viral madura fue establecida al identificarse partículas denominadas proviriones que contenían RNA y mucho más VP0 que los viriones (219).

Las partículas 14 S son pentámeros inmaduros compuestos por monómeros (protómeros) formados por VP1, VP3 y VP0 (220). Los pentámeros provenientes de viriones maduros poseen un coeficiente de sedimentación algo menor (13,4 S), debido al clivaje de VP0 (181).

En 1957 Mayer et al. (221) encontraron partículas identificadas como cápsides sin RNA, y denominadas actualmente partículas vacías, cuyo coeficiente de sedimentación es la mitad del de los viriones. Esto llevó a pensar que el RNA viral podía penetrar en la cápside vacía o que la cápside se ensamblaría alrededor del RNA. Jacobson y Baltimore propusieron la hipótesis de la procápside (222,84) que sugieren dos posibilidades: i) el RNA se inserta de alguna manera en la partícula vacía (modelo de inserción), o ii) el RNA se envuelve alrededor de la procápside, desencadenando cambios en la estructura de la cápside que provocan la internalización del RNA y la maduración del virión (modelo de la transfiguración). Sin embargo cómo se empaqueta el RNA en los viriones es el aspecto más controversial en la morfogénesis de los picornavirus.

1.8.9 Variabilidad del VFA.

Una de las características más sobresalientes del VFA es probablemente el alto grado de variación que presenta su antigenicidad, virulencia y patogenicidad.

El alto grado de variación antigénica ha determinado que se distingan 7 serotipos, dentro de los cuales es posible encontrar más de 60 subtipos (ver 1.8.2). La constante aparición de nuevos subtipos aislados constantemente del ganado, en áreas endémicas, es uno de los principales inconvenientes en el control de la enfermedad. Estas nuevas variantes aparecen como consecuencia de la deriva antigénica (ver 1.4 a 1.6) que provoca la aparición de nuevos brotes, inclusive entre el ganado vacunado, que presenta poca protección cruzada. Es por ello que es necesario un seguimiento constante de las cepas actuantes, y el reemplazo en las campañas de vacunación por aquellas cepas encontradas en el campo en ese momento.

Inicialmente utilizando técnicas de virología clásica fue posible determinar que la reversión en mutantes termosensibles en algunas cepas del VFA era del orden de 10^{-4} . En la revisión que hace Bachrach sobre la fiebre aftosa (69) pueden encontrarse evidencia sobre la alta variabilidad del VFA cuando se somete a alguna presión selectiva capaz de segregar las poblaciones virales. En muchos casos estos experimentos utilizan cultivos celulares debido a que es posible cuantificar la aparición de mutantes y analizarlas posteriormente. Es posible notar cambios en la población viral en: i) pasajes prolongados del virus en cultivos celulares, ii) células persistentemente infectadas, iii) pasajes seriados a temperaturas subóptimas, iv) selección por anticuerpos presentes en el medio, o v) cualquier otro agente que cause desequilibrio, es decir que modifique las presiones selectivas actuantes en el sistema hasta ese momento. Estos cambios no son muy evidentes cuando se realizan pocos pasajes

seriados en cultivos celulares en condiciones óptimas de crecimiento del virus.

Con la aplicación de técnicas de Biología Molecular en Virología, fue posible analizar con más detalle el fenómeno de variabilidad. El análisis por competición-hibridización de los RNAs de los tipos virales A, O, C, SAT1, SAT2 y SAT3 demostró una homología del 44-70 % entre los tipos A, O y C, y mayor al 70% dentro del mismo serotipo (223,224). En cambio entre los tipos A, O y C comparados con los SAT se encontró una homología menor, que variaba entre un 25% y un 40% mientras que entre los SAT la homología era del 65% (225). Con la utilización del mapeo bidimensional de oligonucleótidos (ver 1.9 y Materiales y Métodos) fue posible caracterizar aún más las cepas virales, y cuantificar los cambios ocurridos (226-228). Tanto en cepas aisladas de campo como en estudios utilizando virus clonados, pasados por distintos sistemas huéspedes y segregación de las poblaciones virales, fue posible determinar el alto grado de variabilidad genómica del VFA (229).

Con el advenimiento de las técnicas de Ingeniería Genética y su aplicación a la Virología se obtuvieron sondas específicas y secuencias de distintas cepas del VFA. Utilizando sondas de cDNA se demostró una mayor homología entre las proteínas no estructurales y una menor entre las estructurales de distintas cepas (229). Esto fue corroborado al analizar las secuencias de distintas regiones del genoma del VFA, especialmente comparando la replicasa viral con la proteína VP1 (230,231).

La gran atención que ha suscitado la variación antigénica del VFA se debe especialmente a la importancia económica de esta enfermedad. Algunos autores han sugerido que bajo la gran presión selectiva en el campo, dada por la existencia de animales vacunados, se seleccionan variantes que provocan las rupturas de inmunidad debido a que no son eficientemente neutralizadas por los anticuerpos de animales inmunizados

o convalescientes (43,232-235). Esta selección se ve favorecida por la existencia de ganado no vacunado o protegido parcialmente, y por la presencia de animales salvajes susceptibles al VFA que se encuentran en las cercanías de los lugares de cría (234,236). Otro factor que se suma a las posibles razones de la alta variabilidad antigénica de este virus, es el amplio rango de huéspedes donde el virus puede multiplicar (237). Todo esto se confirma al observarse un mayor número de subtipos en áreas donde el virus infecta animales salvajes (como sucede en África) y en regiones donde la enfermedad es endémica (como lo es en Sudamérica) (239).

Cuando se compararon las secuencias nucleotídicas de VP1 se determinó la existencia de dos zonas que presentaron una variabilidad mayor, una ubicada entre los aminoácidos 40 y 60, y la segunda entre los aminoácidos 140 y 160. Únicamente la región carboxilo terminal de VP1 demostró ser inmunogénica, correlacionándose la hipervariabilidad de la región 140-160 con cambios antigénicos (ver 1.8.3 y 1.8.4).

Desde hace algún tiempo se conoce que el VFA se adapta fácilmente a distintos tipos de cultivos celulares. Recientemente se ha reportado que en un solo pasaje por células BHK de un VFA subtipo A12(AVR1), derivado de bovinos, se seleccionaron distintas variantes que presentaron cambios en los aminoácidos 148 y 153 de VP1 con un escaso poder de neutralización cruzada (240). Esta rápida generación de variantes inmunogénicas del VFA tipo A, puede afectar la producción en gran escala de vacunas a partir de células BHK. Es en el tipo A en donde, a parte de observarse un mayor número de subtipos (más de 35), se produce una evolución más rápida (69,236). Algunos autores se preguntan si existe algún otro mecanismo distinto de los errores que causa la replicasa viral (ver 1.1 a 1.6) y cuya consecuencia es el alto grado de deriva antigénica que presenta el VFA. Weddell et al. (74) al secuenciar el cDNA de VP1 de distintos subtipos del tipo A, y compararlos entre sí y con otros previamente secuenciados,

sugirieron la existencia de una región que potencialmente puede formar una estructura secundaria muy estable que involucra la región hipervariable. Esto provocaría un aumento en la frecuencia de mutación de este locus, pues la replicasa tendría dificultades al replicar esta zona que codifica para un importante determinante antigénico, produciendo variantes más frecuentemente que las encontradas en otras regiones del genoma. Este efecto de la estructura secundaria en la replicación del RNA fue reportado previamente para el bacteriofago QB (241), y probablemente sea común para los virus a RNA que presentan mucha variación antigénica.

Al analizar las secuencias del cDNA correspondientes a VP1 de dos aislamientos de la cepa C3 Indaial, uno ocurrido en 1971 y el otro en 1978, mantenidos independientemente en Pirbright y Ginebra, se observó una gran diferencia en la región hipervariable. Se desconoce si estos cambios se produjeron por la presión inmunológica en el campo, antes de los aislamientos, o por los diferentes pasajes del virus hechos en los laboratorios (242).

Si bien existe mucha información sobre la alta variabilidad del VFA, especialmente del tipo A, el mecanismo por el cual se genera una tan alta diversidad antigénica queda aún por ser aclarado. Es más, si la estructura secundaria del RNA juega un papel importante en el tipo A, cabe la pregunta de si se puede generalizar esto a los otros tipos virales, siendo esta cuestión a resolver uno de los objetivos de esta Tesis.

1.9. MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÓMICA DE LOS VIRUS A RNA.

El análisis electroforético del genoma ha permitido separar los fragmentos que lo componen (en el caso de genoma segmentado), y además a permitido analizar deleciones e inserciones. En general a los genomas de simple cadena se

los somete a geles desnaturalizantes (243), en cambio a los de doble cadena se los puede separar utilizando geles nativos. En algunos casos al utilizar geles que no son completamente desnaturalizantes, es posible separar segmentos homólogos de diferentes cepas (244).

La hibridación molecular permitió cuantificar el grado de homología entre genomas. El método se basa en la formación y estabilidad de los híbridos RNA-RNA y RNA-DNA y en la susceptibilidad de las zonas no apareadas a nucleasas más específicas para simple cadena tales como RNasa T1 o nucleasa S1. Se han utilizado técnicas de hibridación entre moléculas de simple cadena (245,246), de hibridación competitiva entre estructuras de doble cadena (225) y de hibridación de RNA con cDNA (229). Ultimamente con el desarrollo de sondas de RNA simple cadenas sintetizadas "in vitro" a partir de promotores de procariotas tales como el de los bacteriofagos SP6 y T7, se han obtenido híbridos más estables y con mayor actividad específica (247).

El mapéo de oligonucleótidos obtenidos por digestión con RNasas específicas a partir del RNA genómico ha permitido realizar estudios de variación genómica en forma sencilla y rápida, sin embargo en la actualidad existen técnicas más precisas que nos brindan más información. No obstante ello, se los sigue utilizando para el análisis epidemilógico de cepas, y como una visión general del genoma. El análisis de mezclas complejas de oligonucleótidos por electroforesis bidimensional (mapéo de oligonucleótidos) fue desarrollada por Wachter y Fiers en 1972 (248). Se emplea RNA marcado preferentemente por crecimiento de virus en medio con ^{32}P -fosfato. El RNA se digiere con una RNasa específica, que deja oligonucleótidos con sus extremos 5' desfosforilados, que pueden ser marcados "in vitro" utilizando un método alternativo con ATP gama ^{32}P y polinucleotido quinasa (ver Materiales y Métodos). Los oligonucleótidos resultantes de la digestión se separan mediante electroforesis bidimensional en geles

de poliacrilamida. La primera dimensión se lleva a cabo a pH 3,5 y 6M urea en un gel 10 %. En estas condiciones las bases citosina y adenina presentan un grupo protonizado más que la guanosina y uracilo (259). La movilidad en esta dimensión es dependiente de la composición de bases de los respectivos oligonucleótidos. En la segunda dimensión el gel es 20% y tiene un pH de 8.3, que determina que las cuatro bases estén cargadas igualmente y la movilidad dependa del tamaño de los oligonucleótidos. De esta forma es posible separar oligonucleótidos de igual tamaño y distinta composición, obteniéndose una distribución de manchas en las autoradiografías característica de cada RNA. Los oligonucleótidos únicos bien aislados representan en el caso del VFA el 7% de la secuencia total. Este porcentaje que depende de la complejidad de las moléculas analizadas puede llegar a un 50% cuando se analizan RNAs de menor tamaño (231). El método permite detectar mutaciones puntuales, deleciones e inserciones que afectan a los oligonucleótidos (249,9).

La secuenciación del RNA es un método más difícil que la secuenciación de DNA, y solo permite conocer secuencias relativamente cortas. Existen dos métodos, el de degradación parcial y específica con nucleasas (250), y el de degradación química (251).

Para conocer porciones más extensas de secuencias genómica es necesario obtener el cDNA copia del RNA, mediante la utilización de la transcriptasa reversa. Estos cDNA pueden ser amplificados mediante técnicas de DNA recombinante (243), o secuenciados directamente. La síntesis de oligonucleótidos que pueden servir como iniciadores para la transcriptasa reversa ha simplificado mucho el clonado y secuenciación rápida de regiones específicas del genoma viral. En todos los casos el cDNA obtenido puede ser secuenciado por dos métodos, el de los terminadores de cadena (252) o el degradativo (253).

1.10. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

La presente Tesis Doctoral se refiere a uno de los aspectos de mayor importancia de la biología molecular del VFA. El alto grado de variabilidad que presenta este virus a RNA.

Dentro de este vasto aspecto, se focaliza en la intervención de la célula huésped como inductora y selectora de variantes virales. Para ello se toma como modelo experimental a los pasajes seriados por distintos sistemas celulares de un virus clonado. Debido a la ausencia de la presión del sistema inmune, las variantes se producen y seleccionan únicamente por la intervención de la célula huésped.

El virus empleado pertenece al serotipo C, cuyo grado intermedio de variabilidad, con respecto al de los serotipos A (muy variable) y O (más estable) ha sido poco estudiado.

El objetivo general de este trabajo es el estudio de la variabilidad del tipo C del VFA, dentro del cual se pueden distinguir 4 objetivos concretos:

- 1) Determinación del efecto de la célula huésped en la variabilidad viral, puesta en evidencia por la aparición de cambios fenotípicos en las poblaciones generadas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares empleados como huéspedes.

- 2) Análisis de los genomas de las distintas poblaciones virales aparecidas durante los pasajes seriados. Para ello se utiliza el análisis bidimensional de oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1, que permite tener una visión general del genoma viral, y cuya utilidad y limitaciones se discuten.

- 3) Cuantificación de los cambios producidos en la región carboxilo terminal de la cepa C₃ Resende con respecto a otras cepas del mismo serotipo, por medio del análisis de las secuencias nucleotídicas. Determi-

nación de los cambios en la estructura secundaria del RNA genómico, y de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP1, deducida de las secuencias nucleotídicas.

4) Análisis de las secuencias de la región carboxilo terminal de VP1 de las distintas poblaciones virales surgidas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares, y determinación de la selección de variantes en la región hipervariable de VP1 (variantes antigénicas).

Los resultados obtenidos en los puntos 1) a 4) se relacionan esbozando un mecanismo de variabilidad intermedio para el serotipo C, cuyas implicancias se discuten.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CÉLULAS.

Se utilizaron las líneas celulares BHK-21, clon 13 (254) e IBRS-2 (255), provistas por el Centro panamericano de Zoonosis, Pcia. de Buenos Aires, y cultivos primarios de riñón fetal bovino (RFB) y testículo fetal bovino (TFB) preparados en la sección Cultivo de Tejidos del Depto. de Virología del C.I.C.V., I.N.T.A.. Todos los tipos de cultivos fueron propagados en monocapas (256) con medio mínimo esencial Eagle (MEM) suplementado con 10% de triptosa fosfato y 10% de suero de ternera (Gibco, Laboratories Grand Island, USA).

2.2 VIRUS.

Se utilizaron las cepas del VFA C₃ Resende y O₁ Campos, provistas por el SELAB del Servicio Nacional de Sanidad, Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación.

En todos los casos los virus fueron extraídos de epitelio lingual bovino y sometidos a dos pasajes por células BHK-21, clon 13.

Los stocks de virus obtenidos por pasajes seriados (ver 2.4) y los utilizados para la purificación de viriones (ver 2.6) fueron conservados a -70°C.

2.3 PROCEDIMIENTO DE CLONADO DEL VFA CEPA C₃ RESENDE (106).

Se prepararon monocapas de células BHK-21 en frascos planos de 60 ml, que al estar confluentes poseen aproximadamente $3,5 \cdot 10^6$ células. Luego de volcar el medio de crecimiento las monocapas fueron lavadas con MEM sin suero, e inoculadas con diluciones al 1/10 de virus en MEM. Luego de un período de adsorción de 45 min a 37°C, se retiró el líquido por succión, y se agregó 5 ml de la siguiente mezcla: un volumen de 1,8% bactoagar en agua (solución estéril) y un volumen de MEM 2X suplementado con antibiótico, caldo triptosa fosfato, 50 µg/ml gentamicina, 25 µM HEPES (ácido

N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfónico, Sigma Chemical Co.) pH 7,4. Una vez gelificada la suspensión de agar, se incubaron los frascos a 37°C hasta que las placas de lisis fueron visibles (48 a 72 horas). El revelado de las mismas se realizó con 1 ml de rojo neutro (0,02% concentración final) por frasco incubandolos durante 1 a 3 horas a 37°C en oscuridad.

Tres placas de lisis, representativas de la mayoría de las placas (por morfología y tamaño), fueron picadas con pipeta Pasteur de punta curva y cada una de ellas fue inoculada en un tubo con una monocapa de células BHK-21 con el objeto de amplificar la cantidad de virus (purificación en placa). Una de las clonas obtenidas de esta forma fue seleccionada al azar y utilizada como inóculo para un nuevo ciclo de purificación en placa. Este procedimiento de clonado se repitió tres veces consecutivas para asegurarse que la población viral proviene de una sola partícula inicial, y no de un grupo de ellas.

Después del último ciclo de purificación, una de las clonas seleccionadas fue crecida en un frasco plano de 2.000 ml con una monocapa confluyente de células BHK-21. Luego del efecto citopático total se cosechó, alicuotó y guardó a -70°C. Se denominó a este Stock C3 clon y se lo utilizó como inóculo inicial de los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares.

2.4 PASAJES SERIADOS DEL C3 CLON POR DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.

Para realizar los pasajes seriados del C3 clon se utilizaron botellas planas de 60 ml con monocapas confluentes de células conteniendo aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células BHK-21, o 10^6 células de c/u de los otros sistemas celulares utilizados (IBRS-2, RFB, y TFB).

En todos los sistemas celulares se procedió igualmente. Las monocapas fueron lavadas con MEM sin suero, e infectadas con un inóculo de 1 ml proveniente del pasaje anterior por el mismo sistema celular, conteniendo alrededor de 5×10^6 DICT50 tomadas en RFB (m.o.i. entre 1 y 10). Luego de 60 min de adsorción a 37°C

se retiró el inóculo y se agregaron 5 ml de MEM suplementado con caldo triptosa fosfato, 50 µg/ml gentamicina, 25 µM HEPES pH 7,4. Las monocapas infectadas fueron incubadas a 37°C y se cosechó el sobrenadante luego del efecto citopático total. Estos stocks antes de ser congelados fueron clarificados centrifugando 30 min a 3.000 xg. Este procedimiento fue repetido 20 veces para cada sistema celular, rotulándose cada pasaje de acuerdo al número de ciclos desde el pasaje inicial con el C3 clon. La nomenclatura adoptada explicita el sistema celular utilizado y el número de pasaje, por ejemplo el pasaje 15 por células BHK-21 se lo denominó BHK15. Los stocks producidos en células IBRS-2 se denominaron desde IBRS1 hasta IBRS20, los provenientes de RFB desde RFB1 hasta RFB20, los de TFB desde TFB1 hasta TFB20, y por último los provenientes de células BKK-21 desde BHK1 hasta BHK20.

2.5 TITULACIÓN DE LOS VIRUS.

Los stocks virales fueron titulados mediante dos métodos.

2.5.1 Titulación en cultivo de tejidos.

La determinación de las dosis infectante cultivo de tejido 50% (DICT50) se realizó en monocapas de células BHK-21 y RFB. Para ello se crecieron las células en placas de plástico de 96 orificios hasta que se completaran las monocapas (48 horas). Las infecciones se hicieron con 0,1 ml de diluciones al 1/10 del stock viral en MEM suplementado con caldo triptosa fosfato, 50 µg/ml gentamicina, 25mM HEPES pH 7,4 y 10 mM Tris-HCl pH 7,4 (Trizma base, Sigma Chemical Co.) utilizando 6 orificios por dilución. La incubación se llevó a cabo a 37°C en atmósfera de 3% anhídrido carbónico, y el efecto citopático fue controlado diariamente, registrando los datos finales a las 72 horas post-infección mediante el método de Reed y Muench (257).

2.5.2 Titulación en ratón lactante.

Para determinar la patogenicidad de la población viral se utilizaron ratones de 4 a 6 días de la cepa CF1.

Se inocularon seis ratones lactantes (RL) por vía intraperitoneal con 0,05 ml de c/u de las diluciones al 1/10 del virus. Los ratones fueron controlados diariamente para determinar el número de animales muertos por dilución del virus. Los datos obtenidos a los 7 días fueron considerados definitivos, cuantificandose la dosis letal 50% (DL50) por el método de Reed y Muench (257). Los RL que murieron durante la titulación fueron sometidos al test de fijación de complemento con el objeto de determinar que la muerte se produjo por la presencia del virus. Para ello se los maceró, inactivó a 56°C durante 30 min, se los centrifugó y efectuó la tipificación viral enfrentándolos con sueros hiperinmunes de cobayos (258).

2.6 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE VIRIONES (259).

Se realizaron pasajes de virus utilizando un mayor número de células, con el objeto de obtener suficiente inóculo para infectar frascos rotantes con monocapas de los distintos sistemas celulares. Se mantuvieron las condiciones de infección empleadas en los pasajes a menor escala (m.o.i., temperatura de incubación, medio de infección, etc). Estos inóculos, para los frascos rotantes, fueron mantenidos a -70°C hasta el momento de la infección.

Las infecciones se realizaron en 10 botellas rotantes de 1,5 litros. Normalmente los frascos fueron lavados con MEM e inoculados con una m.o.i. entre 1 y 10. Luego de adsorber el virus por 60 min a 37°C, el inóculo fue retirado y se agragaron entre 15 y 20 ml de MEM suplementado con caldo triptosa fosfato, 50 µg/ml gentamicina y 25 mM HEPES pH 7,4. El virus fue cosechado al observarse efecto citopático total, se lo preclarificó a 3.000 xg durante 30 min y se lo congeló a -70°C.

El primer paso en la purificación consistió en centrifugar

los sobrenadantes virales a 14.000 xg durante 15 min a 4°C, con el objeto de clarificarlos. Luego fueron centrifugados a 144.000 xg durante 55 min a 4°C. El precipitado que contenía a los viriones fue resuspendido en 0,5 ml de NET (10 mM Tris-HCl pH7.2, 100 mM NaCl, 1mM EDTA), luego se agregó 1% de sarkosil (Sigma Chemical Co.) y se centrifugó 5 min a 15.000 xg. El sobrenadante de esta centrifugación fue sembrado en un gradiente lineal 5-30% de sacarosa en NET (p/v) y ultracentrifugado durante 75 min a 200.000 xg en rotor Beckman SW40 a 4°C. Al final de la corrida el gradiente fue fraccionado en alrededor de 25 alícuotas de 0,5 ml c/u y el pico de virus fue identificado por medida de la absorbancia a 260 nm. Se juntaron las fracciones correspondientes al pico de viriones, y se las congeló a -70°C.

2.7 PREPARACIÓN DEL RNA VIRAL.

Todas las soluciones utilizadas en pasos que involucren la manipulación de RNA fueron tratadas con dietilpirocarbonato (DEP) (Sigma Chemical Co.), excepto el Tris y el EDTA que fueron preparados con agua previamente tratada con DEP (agua-DEP). Esta precaución fue tomada con el objeto de eliminar las ribonucleasas presentes que podrían digerir el RNA. Para ello a cada 100 ml de solución se le agregó 100 µl de DEP, se la dejó reposar durante la noche y se la autoclavó por 60 min.

Se diluyó el pico de virus (ver 2.5) con un volumen de NET, se añadió 0,5% de SDS (Sigma Chemical Co.) y un volumen de fenol (el fenol utilizado en todos los pasos de este trabajo fue redistilado y equilibrado con 100 mM tris-HCl pH7.4), se agitó en vortex y se añadió un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1 v/v), se agitó nuevamente y se dejó reposar 1 min. Se centrifugó a 10.000 xg durante 5 min con el objeto de separar la fase acuosa que contiene el RNA. Esta operación de extracción fue repetida dos veces pero sin el agregado de SDS. Luego se extrajo tres veces con eter etílico, y se pasó a un tubo estéril en donde se agregó 0,3 M de NaCl y dos volúmenes de etanol. Se dejó precipitar toda

la noche a -20°C , y se centrifugó a 10.000 xg durante 60 min a 4°C . El RNA fue resuspendido en NET y sembrado en un gradiente 15-30% sacarosa en NET (p/v) conteniendo 0,5% sarkosil. Se ultracentrifugó a 200.000 xg durante 6 horas a 4°C en rotor Beckman SW40. Se fraccionó en 25 alícuotas y se ubicó al RNA genómico en la zona correspondiente a 37 S por absorbancia a 260 nm. Se juntó el pico y se lo diluyó al medio con NET. Se extrajo con fenol y eter y se precipitó con etanol. Se resuspendió el RNA en 0,5 ml de agua DEP y se lo reprecipito con etanol en tubos tipo Ependorff. Esta última precipitación fue rápida, congelando la muestra a -70°C , centrifugando en frío a 15.000 xg durante 15 min, lavando el precipitado con etanol 70% frío, luego de lo cual se secó con vacío, se lo resuspendió en 50 μl de agua DEP y se lo congeló a -70°C .

2.8 MAPÉO BIDIMENSIONAL DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Para comparar las secuencias de oligonucleótidos que componen los genomas a RNA se utilizó la técnica de separación de oligonucleótidos resistentes a la digestión con RNasa T1 en geles de poliacrilamida (ver 1.9) (248).

Se utilizaron dos técnicas distintas para el marcado del RNA viral. En una de ellas los oligonucleótidos son obtenidos primero y luego marcados "in vitro" (261), mientras que en la otra el RNA viral es marcado "in vivo" y purificado a partir de un extracto citoplasmático (262). En ambos casos las condiciones de electroforesis bidimensional son las mismas.

2.8.1 Obtención de oligonucleótidos marcados "in vitro".

Dos microgramos del RNA obtenido en el punto 2.7 fueron precipitados con etanol, resuspendidos en 5 μl de TE (10 mM tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) y digeridos con 8 unidades de RNasa T1 (Sankyo, Calbiochem) incubando a 37°C durante 45 min. Para completar la digestión y debido a la presencia de estructura

secundaria del RNA, se lo desnaturalizó calentando 2 min a 100°C y enfriando rápidamente luego de lo cual se agregó 8 unidades más de RNasa T1 y se continuó la digestión por 30 min más.

Los oligonucleótidos obtenidos poseen un grupo hidroxilo en el extremo 5', y pueden ser fosforilados directamente. Para ello se agregaron 50 µCi de ATP-gama ^{32}P (2.000-3.000 Ci/mmol, New England Nuclear Co.) en 25 µl de agua, 5 µl de 0,1 M $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ pH 9.5, 5 µl 0,1 M acetato de magnesio, 5 µl 50 mM DTT (Sigma Chemical Co.) y 2 unidades de polinucleótido quinasa (T_4 infected E. coli B., P/L Biochemicals, Inc.). Al cabo de 2 horas de incubación se agregó 5 µg de tRNA (Sigma Chemical Co.) y se extrajo con fenol, para luego precipitar los oligonucleótidos marcados con 2 volúmenes de etanol y 0,3 M NaCl a -20°C durante 30 min. Luego de centrifugar 15 min a 15.000 xg, el precipitado fue secado por vacío y resuspendido en 3 µl de ET.

2.8.2 Obtención de RNA inducido marcado "in vivo" y su digestión con RNasa T1.

Este método se basa en el marcado isotópico diferencial del RNA viral debido a la inhibición en la síntesis de RNA celular producido por el agregado de Actinomicina D y por el efecto de la infección viral. Además mediante la precipitación diferencial del RNA de simple cadena al utilizar 2M LiCl, se separan los (+)RNA virales de los (-)RNA que se encuentran formando complejos de doble cadena (262).

Se adoptó el siguiente protocolo:

- Un frasco rotante con una monocapa de alrededor de 10^8 células fue infectado con una m.o.i. de 1 a 10, según punto 2.6.
- Luego de 1,5 horas post-infección se volcó el medio y se agregó MEM sin fosfatos.
- Se cambió el medio a los 60 min por MEM sin fosfatos conteniendo 3 µg/ml actinomicina D (Sigma Chemical Co.).
- A los 15 min se agregó 2 mCi de ácido ortofosfórico ^{32}P (CNEA, Argentina).

-Cuando las células comenzaron a redondearse (efecto citopático) se sacó el MEM y se agregó 10 ml de 0,05% Tritón X-100 (Sigma Chemical Co.) en NET. Se agitó en frío durante 5' para que se desprendiera la monocapa.

-Se centrifugó 3 min a 2.000 xg en frío para precipitar los núcleos celulares.

-Se pasó el sobrenadante a otro tubo y se agregó 1,5 ml de 10% SDS.

-Se extrajo con fenol, cloroformo y eter, y se precipitó con etanol (ver 2.7)

-Se resuspendió en 0,7 ml de NET y se agregó un volumen de 4M LiCl, se dejó precipitando a 4°C toda la noche y se centrifugó 15 min a 15.000 xg.

-El RNA fue reprecipitado con LiCl nuevamente, para finalmente resuspenderlo en 0,5 ml de NET y sembrarlo en un gradiente de sacarosa 15-30% corrido según las condiciones del punto 2.7, con la diferencia de que el pico de RNA fue determinado por radiactividad.

-Se digirió el RNA con RNasa T1 en condiciones de digestión similares a las del punto 2.8.1. -Se agregó 5 µg de tRNA y se extrajo con fenol. Se precipitó con etanol, luego de lo cual se secó el precipitado con vacío y se lo resuspendió en 3 µl de TE.

2.8.3 Condiciones de la electroforesis bidimensional.

Los oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1 obtenidos en los puntos 2.8.1 y 2.8.2 fueron resuspendidos en 3 µl de TE. Se les agregó 5 µl de 9M urea, 6 µl de glicerol y 5 µl de una mezcla de colorantes (2 g/l xilencianol-2 g/l azul de bromofenol) para luego sembrarlos en un gel de primera dimensión.

El gel de la electroforesis de la primera dimensión tuvo la siguiente composición: 10% acrilamida, 0,33% N N' metilenbisacrilamida; 25 mM ácido cítrico; 6 M urea, con un pH resultante de 3.5. El gel 1,5 mm de espesor se lo polimerizó en platos de vidrio de 20 x 40 cm agregando sulfato ferroso heptahidratado (10 µg/ml)

ácido ascórbico (4 µg/ml) y peróxido de hidrogeno (0,012%) como catalizadores. El gel fue corrido a 4°C sometido a 500 V hasta que el azul de bromofenol hubo recorrido 20 cm. Luego de la autorradio grafia se cortó la zona del gel que contenía los oligonucleótidos para separarlos en la segunda dimensión.

La composición del gel en la segunda dimensión fue: 20% acrilamida; 0,66% N N' metilenbisacrilamida; TBE pH 8.3. Para la polimerización de la acrilamida se añadieron persulfato de aminio (0,4 g/l) y TEMED (0,04 %). La electroforesis se desarrolló a 4°C y 450 V hasta que el colorante azul de bromofenol alcanzó los 16 cm de distancia desde el origen. Para la autorradiografía se utilizó pantalla intensificadora (Dupont), exponiendo los geles a temperatura ambiente.

2.9 CLONADO MOLECULAR DEL GENOMA DEL VFA.

Basicamente se siguieron los métodos descriptos en el Manual de Clonado Molecular de Maniatis et al. (243). Los protocolos seguidos se hallan a continuación.

2.9.1 Obtención de la primera cadena de cDNA.

Se utilizó el RNA purificado en el punto 2.7 como templado de la transcriptasa reversa, con el objeto de copiar a partir del RNA genómico una cadena complementaria de cDNA.

Debido a que el RNA del VFA está poliadenilado en su extremo 3', se utilizó como iniciador de la síntesis de cDNA a oligo (dT)₁₂₋₁₈ que al hibridarse al poli (A) permite el "enganche" de la transcriptasa reversa. En todos los casos se utilizaron entre 5 y 10 µg de RNA, procediéndose de la siguiente forma:

-Se mezclaron 25 µl de RNA con 25 µl de dCTP alfa-³²P conteniendo 50 µCi (3.000 Ci/mmol, Amersham) y 50 µl de 2X mix.

2X mix

1 M Tris-HCl pH 8.3	5 μ l
1 M MgCl ₂	1 μ l
2 M KCl	2,5 μ l
5 mM mezcla(dATP,dCTP,dGTP v TTP)* (Pharmacia)	10 μ l
40 mM DTT (Sigma Chem. Co.)	1 μ l
1 mg/ml oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (Pharmacia)	3 μ l
0,1 M NaPPi	4 μ l
agua DEP	23,5 μ l

	50 μ l

*: Mezcla de los 4 deoxinucleótidos trifosfato conteniendo una concentración final de 5 mM de cada uno.

-Se agregó 1 μ l de Transcriptasa reversa (25 unidades/ μ l, Life Sciences, Inc.), y se incubó a 42°C durante 60 min.

-Se tomó 2 μ l para determinar el número de cuentas incorporadas al cDNA para lo cual se agregaron 1 μ g de tRNA (10 μ g/ml) y 5 ml de ácido tricloroacético 5% conteniendo 1% fosfato y 1% pirofosfato de sodio (ICA-Pi.PPi) a 0°C. El material ácido insoluble fue recogido en filtros de nitrocelulosa, y contados por el método de Cerencov.

-Se extrajo con fenol y se precipitó con 2 volúmenes de etanol y 0,3 M acetato de sodio pH 5,2 (AcooNa) durante 1 hora a -70°C.

-Se centrifugó a 15.000 xg 15 min, se lavó el precipitado con etanol 70% y se lo secó con vacío.

-Se resuspendió en 50 μ l de buffer alcalino (300 mM NaHO-5 mM EDTA) con el objeto de hidrolizar el RNA, y se incubó durante 3 horas a 37°C.

-Se neutralizó con 50 μ l de 1M Tris-ACOOH pH 5.2.

-Se precipitó con 2 volúmenes de etanol a -70°C durante 1 hora, se centrifugó a 15.000 xg 15 min, se lavó con etanol 70% y se secó al vacío.

-Se resuspendió en 50 μ l de agua DEP.

2.9.2 Síntesis de la segunda cadena de cDNA.

Para sintetizar la segunda cadena de cDNA se utilizó la enzima DNA polimerasa I fragmento Klenow, que es capaz de estabilizar algún bucle en la cadena simple del cDNA que cumple funciones de iniciador. Esto permite la formación de cDNA de doble cadena a partir del templado de la primera cadena de cDNA. La segunda cadena de cDNA tiene la misma polaridad que el RNA de los viriones.

El protocolo utilizado es el siguiente:

-Se mezclaron 45 μ l del cDNA primera cadena obtenido en el punto 2.9.1 con 20 μ l de 5X mix, 1 μ l 5 mM mezcla de nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y TTP), y 34 μ l de dCTP alfa-³²P conteniendo 50 μ Ci (3.000 Ci/mmol, Amersham).

5X mix

1 M Tris-HCl pH7.5	5 μ l
1 M MgCl ₂	2,5 μ l
0,5 M DTT	5 μ l
agua	87,5 μ l

	100 μ l

-Se agregó 1 μ l de DNA polimerasa I fragmento Klenow (4 unidades/ μ l Boehringer Mannheim) y se incubó a 37°C durante 1 hora.

-Antes y después de la reacción se tomaron 5 μ l para determinar el número de cuentas ácido insolubles (se procedió similarmente al punto 2.9.1 en este paso) calculándose el rendimiento de la reacción.

-Se extrajo con fenol y 3 veces con éter.

-Se agregó 100 μ l de 4 M acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol, con el objeto de impedir la precipitación de los deoxinucleótidos trifosfato. Se congeló a -70°C, se centrifugó a 15.000 xg. se lavó el precipitado con etanol 70% y se secó con vacío.

-El cDNA de doble cadena fue resuspendido en 5 μ l de TE.

2.9.3 Tratamiento con nucleasa S1.

Las moléculas de cDNA de doble cadena obtenidas en el punto

2.9.2 poseen en uno de sus extremos un bucle de simple cadena. Para poder clonar estas moléculas es necesario hidrolizar el bucle. Para ello se utilizó a la nucleasa S1 que es capaz de digerir en determinadas condiciones de concentración al DNA de simple cadena y no al de doble cadena. Por lo tanto es necesario una previa titulación de la enzima con cada cDNA.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

-Los 5 µl del cDNA de doble cadena del punto 2.9.2 fueron mezclados con 495 µl de buffer S1 (300 mM NaCl, 30 mM ACOONa pH 4.5, 3 mM ZnCl₂).

-A 9 µl del cDNA en buffer S1 se le agregó 1 µl de una de las diluciones de la nucleasa S1 (50 unidades/µl, Pharmacia). De esta forma se realizó una curva de calibración de la enzima S1 entre 10⁻¹ y 10⁻⁶. Se incubó a 37°C durante 30 min, se agregó 3 µl de azul de bormofenol en 10X buffer alcalino y 50 % glicerol. En un gel de agarosa 1,5% alcalina se sembraron las distintas diluciones de la curva de calibración, 5 µl de cDNA doble cadena sin digerir y 5 µl de la primera cadena. La electroforesis se desarrolló a 8 V/cm durante 12 horas y se secó el gel antes de exponerlo a autorradiografía.

100X buffer alcalino

10 N NaOH	300 ml
0,5 M EDTA	200 ml
agua	500 ml
	—————
	1.000 ml

Preparación del gel de agarosa alcalina: Se disolvieron 1,5 g de agarosa en 100 ml de agua calentando a 100°C, se enfrió hasta 45°C y se agregó 1 ml de 100X buffer alcalino. Se volcó sobre un plato de vidrio y se lo dejó gelificar durante 30 min. Luego se lo sumergió en una cuba conteniendo 1X buffer alcalino y se realizó la electroforesis.

-En la autorradiografía se determinó la concentración de nucleasa S1 necesaria para obtener una distribución de pesos moleculares

similares a los encontrados en el cDNA de la primera cadena, debido a que la presencia de cDNA de mayor peso molecular se debe a que no se digirió el bucle de la segunda cadena, y la presencia de moléculas de menor tamaño se debe a que se digirieron regiones de doble cadena.

-El resto del cDNA doble cadena se digirió con la concentración establecida para la digestión del bucle de simple cadena con la nucleasa S1, aumentando los volúmenes en escala proporcional a la utilizada en la titulación.

-Se extrajo con fenol y 3 veces con eter. Se agregó un volumen de acetato de amonio 4M, y dos volúmenes de etanol, se congeló a -70°C. se centrifugó a 15.000 xg, se lavó con etanol 70% y se secó con vacío.

-El precipitado se resuspendió en 50 µl de TE.

2.9.4 Agregado de homopolímeros "pegajosos" en los extremos 3' del cDNA de doble cadena.

Con el objeto de poder clonar el cDNA obtenido en los pasos anteriores se sintetizó oligo (dC)(entre 15 y 25 residuos) en los extremos 3' hidroxilo utilizando la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal y dCTP. Las moléculas de cDNA así tratadas tienen la capacidad de hibridarse con moléculas de plásmidos linealizadas que poseen en sus extremos 3' oligo (dG) complementario al oligo (dC) del cDNA. Esto permite que los plásmidos en los cuales se ha insertado el cDNA se recircularicen, y sean capaces de transformar con altas frecuencias a E.coli.

El protocolo utilizado es el siguiente:

-A los 50 µl del cDNA con extremos abiertos obtenidos en el punto 2.9.3 se les agregó lo siguiente:

1 M Cacodilato de potasio pH6.9	35 µl
100 mM CoCl ₂	2.5 µl
40 mM DTT	1 µl
2,3 mM dCTP	2 µl
20 mg/ml seroalbúmina bovina	3 µl
agua	156,5 µl

- Se agregó 1 μ l de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (10 unidades/ μ l, Pharmacia) y se incubó 30 min a 37°C.
- Se extrajo con fenol y se precipitó con 2 volúmenes de etanol y 0,3 M ACOONa, congelando a -70°C, centrifugando a 15.000 xg
- El precipitado se lavó con etanol 70% y se secó al vacío.
- Se resuspendió en 50 μ l de NET.

2.9.5 Anillado del cDNA con el plásmido pBR322.

Las moléculas de mayor peso molecular del paso 2.9.4 fueron purificadas a través de un gel 1% agarosa de bajo punto de fusión en buffer TAE (40 mM Tris-Acetato pH 8.0, 2 mM EDTA). Luego de ser teñido con bromuro de etidio (1 μ g/ml en TAE) se cortó la región del gel deseada y se disolvió la agarosa calentando a 70°C durante 5 min. Luego se agregó un volumen de fenol y se extrajo la fase acuosa (en la interfases queda la agarosa). El cDNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol y 0,3 M ACOONa congelando a -70°C. Se centrifugó a 15.000 xg y se lavó el precipitado con etanol 70%. Luego se secó con vacío se lo resuspendió en 50 μ l de NET. Para calcular el número de moles se tomó como peso molecular promedio al observado en el gel de agarosa de bajo punto de fusión (en el cual se corrieron marcadores de peso molecular). Se determinó la masa comparando con controles corridos en el mismo gel.

El plásmido utilizado fue el pBR322, linealizado por el único sitio de restricción para la enzima Pst I, al que posteriormente se le agregó en sus extremos 3' homopolímeros de dGMP (de 15 a 25 residuos de longitud), utilizando la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal y dGTP (pBR322-Oligo (dG)).

Se utilizó el siguiente procedimiento:

- Se diluyó el cDNA obtenido en el punto 2.9.4 hasta una concentración de 1 ng/ μ l en NET.
- Se diluyó el plásmido pBR322-Oligo (dG) hasta una concentración de 1 ng/ μ l en NET.
- Se mezclaron el cDNA y el pBR322-Oligo (dG) en una relación mol

a mol.

-Se calentó en un baño de agua a 68°C por 5 min, luego de lo cual se apagó el termostato del baño y se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente, procedimiento que duró toda la noche.

2.9.6 Transformación de bacterias con plásmidos que contienen el cDNA del VFA, y selección de colonias Amp^S y Tet^R.

Se utilizó la cepa DH1 de E. coli, cuyas características son F⁻, recA1, end A1, gyr A96, thi-1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), Sup E44, rel A1?, lambda⁻

Para que las bacterias incorporen DNA deben ser tratadas con CaCl₂. Para obtener bacterias competentes se utilizó el siguiente protocolo:

-Se inoculó 5 ml de medio de cultivo LB con 3 colonias aisladas de una placa de Petri conteniendo LB-agar y se creció a 37°C hasta una OD₅₅₀=0,3.

-Se inoculó con el cultivo anterior a 100 ml de LB contenidos en un matraz de Erlenmayer de 1.000 ml. Se dejó crecer a 37°C con agitación fuerte hasta alcanzar una OD₅₅₀=0,48.

-Se enfrió el cultivo en baño de hielo durante 5 min, y luego se precipitaron la bacterias centrifugando a 5.000 xg durante 5 min.

-Se resuspendieron las bacterias en 40 ml de Tfb I (30 mM acetato de potasio, 100 mM KCl, 10 mM CaCl, 50 mM MnCl₂, 15% glicerol, llevar a pH=5.8 con ácido acético) a 0°C. Se dejó en hielo durante 5 min.

-Se centrifugó a 5.000 xg por 5 min a 4°C, y se resuspendió en 4 ml de Tfb II frío (10 mM buffer PIPES, 75 mM CaCl, 10 mM KCl, 15% glicerol, llevado a pH=6.5 con KOH). Se dejó en hielo 15 min.

-Se dividió en alícuotas de 200 µl en tubos tipo Eppendorff, que previamente fueron enfriados en hielo seco, congelándose inmediatamente. Estas bacterias competentes se guardaron por varios meses a -70°C sin que variara la capacidad de incorporar DNA.

El protocolo de transformación utilizado es el siguiente:

-Se descongeló un tubo de bacterias competentes a temperatura

ambiente, y luego se lo incubó a 0°C durante 10 min.

-Se pasó 100 µl de bacterias a un tubo de 5 ml estéril (Falcon 2054) pre-enfriado a 0°C.

-Se agregó 10 µl del plásmido anillado con el cDNA del punto 2.9.5.

-Se incubó a 0°C durante 30 min.

-Se dió un golpe de calor a 42°C durante 90 segundos, y un golpe de frío a 0°C durante 2 min.

-Se agregó 400 µl de LB y se incubó agitando a 37°C durante un hora, permitiendo la recuperación de las bacterias y la expresión de los genes de resistencia.

-Se agregó 3 ml de LB conteniendo 0,7% agar, previamente fundido y mantenido a 45°C.

-Se volcó el contenido del tubo en una placa de Petri que contenía LB-agar con 15 µg/ml de tetraciclina (Sigma Chemical Co.) esparciendolo homogéneamente por toda la placa.

-Se dejó solidificar durante 20 min a temperatura ambiente, se invirtió la placa y se incubó a 37°C durante toda la noche.

Debido a que el sitio de restricción para Pst I se encuentra dentro del gen de resistencia a la ampicilina, las bacterias que tomaron el plásmido serán sensibles a este antibiótico (Amp^S), pero resistentes a la tetraciclina (Tet^R) que se encuentra codificada en otra región del plásmido.

Las colonias que crecieron en la placa de Petri fueron analizadas en cuanto a su capacidad de crecer en presencia de ampicilina y/o tetraciclina. Para ello cada colonia fue picada con un moldadientes estéril, y repicada a una placa con LB-agar-ampicilina (50 µg/ml, Sigma Chemical Co.) y a otra con LB-agar-tetraciclina. Aquellas colonias Amp^S y Tet^R son las que teóricamente deben contener el insertado el cDNA del VFA.

2.10 ANÁLISIS POR RESTRICCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE CONTIENEN EL cDNA DEL VFA.

Con el objeto de analizar los plásmidos que contienen cDNA del VFA, obtenidos en el punto 2.9, se realizaron preparaciones

en pequeña escala, denominadas minipreparados. El DNA plasmídico así obtenido fue digerido con enzimas de restricción. Para ello se usó el siguiente protocolo, denominado método del fenol(263):

-Se crecieron los clones Amp^S-Tet^R en 5 ml de LB conteniendo 15 µg/ml de tetraciclina. Se incubó a 37°C, agitando toda la noche. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 5.000 xg durante 15 min a 4°C. Se resuspendieron en 200 µl 50 mM Tris-HCl pH 8.0 y se las transfirió a un tubo tipo Ependorff.

-Se añadieron 25 µl de 10 mg/ml lisozima (Sigma Chemical Co.) y se incubó a temperatura ambiente por 15 min.

-Se añadió 200 µl de fenol y se invirtió 3 veces.

-Se centrifugó a 15.000 xg durante 15 min, y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Ependorff. Se agregaron 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 15.000 xg durante 5 min.

-La fase acuosa se transfirió de tubo y se extrajo 3 veces con éter etílico.

-Se agregaron 22 µl de 3 M acetato de sodio pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol frío (a -20 °C). Se centrifugó a 15.000 xg durante 15 min. Se lavó con etanol 70% y se secó con vacío.

-Se resuspendió en 50 µl de TE, y se agregó 1 µl de RNasa (1 mg/ml, Sigma Chemical Co.) libre de DNasa.

El DNA plasmídico así obtenido fue digerido con enzimas de restricción. Las restricciones se realizaron de acuerdo con las especificaciones de los proveedores y en un volumen final de 20 µl. Las enzimas de restricción utilizadas fueron de los laboratorios Boehringer Mannheim, New England Biolabs, International Biotechnologies, Inc. o Pharmacia.

Una vez finalizada la digestión del DNA plasmídico, se agregó 2 µl de mezcla de sembrado (2g/l azul de bromofenol en TAE, 50% glicerol). Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa 0,8% en TAE, a 10 V/cm hasta que el colorante recorrió 3/4 del gel. Las bandas se visualizaron al teñir los geles con 1 µg/ml de bromuro de etidio en TAE y exponiendo a luz ultravioleta. Este método se encuentra ampliamente descrito en

Maniatis et al. (243).

2.11 PURIFICACIÓN DEL DNA DE PLÁSMIDOS.

Luego de analizar por restricción los plásmidos obtenidos en el punto 2.10, y de seleccionar aquellos de interés, se procedió a purificarlos con el objeto de secuenciarlos, utilizarlos como sondas, etc. Para ello se utilizó el siguiente protocolo:

-Se creció un cultivo de bacterias en 5 ml de LB con antibiótico correspondiente a la resistencia que lleva codificado el plásmido, agitando a 37°C durante toda la noche.

-Se inocularon 250 ml de LB con el cultivo anterior, en un matríz de Erlenmeyer de 1.000 ml.

-Se creció el cultivo hasta una $OD_{600}=0.8$, y se agregó 125 µg/ml de cloranfenicol, con el objeto de amplificar el número de copias del plásmido por célula.

-El cultivo fue incubado agitando a 37°C durante la noche.

-Las bacterias fueron recogidas por centrifugación a 4.000 xg durante 30 min.

-El precipitado se resuspendió en 2,5 ml de 25% sacarosa en 50 mM Tris-HCl pH 7.5.

-Se agregó 0,3 ml de una solución 10 mg/ml de lisozima en 0,25 mM Tris-HCl pH 7.5, y se incubó 5 min a 0°C.

-Se agregaron 4.5 ml de buffer tritón (BT), se invirtió varias veces para mezclar, y se incubó 10 min a 0°C.

-Se colocó cuidadosamente la solución viscosa en 2 tubos de 5 ml c/u y se centrifugó en el rotor Beckman SW 65 Ti a 30.000 rpm por 30 min a 4°C.

-Se midió el volumen del sobrenadante y se agregó 0,95 g de CsCl por mililitro. Se invirtió hasta la disolución del CsCl.

-Se volvió a medir el volumen, y se agregó bromuro de etidio hasta una concentración final de 200 µg/ml.

-Se ultracentrifugó en el rotor SW 65 Ti a 45.000 rpm durante 36 horas a 15 °C.

-Se recolectó la banda inferior correspondiente al plásmido super-

enrollado, teniendo cuidado de no tomar la banda superior que corresponde al DNA cromosómico y al plásmido relajado (243).

-El bromuro de etidio fue extraído con isopropanol saturado con agua y NaCl. Se agregó un volumen de isopropanol, se invirtió se dejó separar las fases, y se removió la fase superior. Se repitió esta operación hasta que no quedó color en la fase superior.

-Se dializó contra 5 mM Tris-HCl pH 7.5, durante la noche, con dos cambios de 1 litro c/u.

-Se determinó la concentración midiendo la absorbancia a 260 nm, y se guardó el DNA a 4°C.

2.12 SECUENCIACIÓN DEL DNA.

El DNA fue marcado rellenando el extremo 5' protuberante dejado por el corte de una enzima de restricción con nucleótidos marcados con ^{32}P . Luego se cortó con otra enzima de restricción dejando moléculas marcadas solamente en uno de sus extremos. Los distintos fragmentos fueron separados por geles de agarosa de bajo punto de fusión y extraídos del gel según punto 2.9.5.

El protocolo utilizado para el marcado radiactivo de los fragmentos fue el siguiente:

-El DNA plasmídico fue digerido con una enzima de restricción de corte único

-Se extrajo con fenol y 3 veces con éter etílico.

-Se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol y 0,3M acetato de sodio. Se congeló a -70°C y se centrifugó a 15.000 xg durante 15 min. Se lavó el precipitado con etanol 70% y se secó con vacío.

-Se resuspendió en 25 μl de TE y se agregaron 10 μl de 5X mix (ver 2.9.2), 1 μl de una mezcla que contiene 0,5 mM de cada uno de los nucleótidos (dCTP, dGTP y TTP), y 14 μl de dATP alfa- ^{32}P conteniendo 50 μCi (600 Ci/mmol, NEN).

-Se añadió 0,5 μl de DNA polimerasa I fragmento Klenow (4 unidades/ μl , Boehringer Mannheim) y se incubó a 37°C por 1 hora.

-Se calentó 15 min a 70°C para inactivar la enzima y se digirió con la segunda enzima de restricción de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

-Se agregó 5 µl de mezcla de sembrado (ver 2.10) y se purificaron los fragmentos mediante un gel 1% agarosa de bajo punto de fusión.

Una vez obtenidos los fragmentos marcados en un solo extremo se procedió a secuenciarlos siguiendo el método y protocolo descrito por Maxam y Gilbert (253). Se emplearon las reacciones específicas para degradación de G (DMS), G+A (ácido fórmico), T+C (hidracina), C (hidracina en 1,5 M NaCl) y A>C (NaOH a 90°C).

Las reacciones de G, T+C y C se llevaron a cabo durante 3 min. y la de A>C se la calentó a 90°C durante 7 min. La reacción de piperidina se desarrolló durante 30 min a 90°C.

Los geles de poliacrilamida se polimerizaron en platos de 40 cm de largo. Se utilizaron geles de 6% de poliacrilamida-TBE como los descritos en el trabajo original. Se los corrió hasta que uno u otro de los colorantes utilizados como marcadores (azul de bromofenol y Xilencianol) recorrieran toda la longitud del gel. Los geles fueron fijados en 10% Metanol-10% ácido acético y secados antes de ser autorradiografiados.

2.13 PREPARACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS E HIBRIDACIÓN EN COLONIAS.

Para establecer la presencia de una secuencia determinada en los clones bacterianos se utilizó el método de hibridación "in situ" (en colonias). Este método rápido permite seleccionar colonias de bacterias que poseen plásmidos de las regiones del cDNA que se desea encontrar. Para ello es necesario poseer una sonda que en nuestro caso se trató de un fragmento de cDNA del VFA obtenido por restricción, el cual fue marcado radiactivamente con ³²P utilizando la técnica denominada "nick translation" (243), basada en la incorporación de nucleótidos marcados a un fragmento de DNA mediante la acción enzimática de la DNA polimerasa I ayudada por la DNasa I. Esta digiere porciones del DNA permitiendo que la polimerasa los rellene. El protocolo utilizado en la marcado del DNA fue el siguiente:

-Se purificó un fragmento de DNA obtenido por restricción a través de un gel de agarosa 0,8% de bajo punto de fusión, en forma similar

a la detallada en el punto 2.9.5.

-Se mezclaron en un tubo Ependorff 25 μ l de DNA (200-300 ng), 5 μ l de mezcla 10X (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM $MgCl_2$), 1 μ l de 5 mM de c/u de los nucleótidos dCTP-dGTP-TTP y 19 μ l de dATP alfa- ^{32}P conteniendo 50 μ Ci (600 Ci/mmol, Amersham).

-Se agregaron 1 μ l de DNA polimerasa I (1unidad/ μ l, Boehringer Mannheim) y 0,5 μ l DNasa I (0,1 μ g/ml, Sigma Chem. Co.).

-Se incubó 1 hora a 16°C.

-Se extrajo con fenol, y se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol y 2 M acetato de amonio con el objeto de que no precipitaran los nucleótidos libres y así poder separar el DNA radiactivo del dATP alfa- ^{32}P no incorporado.

-Se congeló a -70°C, se centrifugó a 15.000 xg, se lavó el precipitado con etanol 70% y se secó al vacío.-

-Se resuspendió el DNA radiactivo en 50 μ l de agua. Por lo general se obtuvo una actividad específica de 10^8 cpm/ μ g.

Para poder hibridar el DNA plasmídico "in situ", se adhirieron las colonias crecidas en LB-agar a un disco del papel de nitrocelulosa. Las bacterias fueron lisadas en el papel y el DNA liberado fue fijado a la nitrocelulosa. Para ello se usó el siguiente protocolo:

-Se crecieron colonias de bacterias en la superficie de una placa de Petri conteniendo LB-agar.

-Se colocó un disco de papel de nitrocelulosa del diámetro exacto de la placa de Petri sobre las colonias, permitiendo que estas se peguen al papel e incubando 2 horas a 37°C .

-Se sacó el papel de nitrocelulosa teniendo cuidado de que las colonias queden pegadas al mismo.

-Se colocó el papel, con las colonias hacia arriba, sobre un papel de filtro Whatman 3MM embebido en 0,5 N NaOH y se lo dejó durante 7 min.

-Se posó el papel de nitrocelulosa con las colonias hacia arriba sobre un disco de papel de filtro conteniendo 0,5 M Tris-HCl pH 7.5 y se lo dejó durante 2 min. Se repitió esta operación una vez más.

-Se colocó el papel de nitrocelulosa sobre otro papel de filtro conteniendo 1X SSC (15 mM citrato de sodio, 150 mM NaCl, pH 7.0), y se lo dejó 5 min.

-Se dejó secar el papel de nitrocelulosa, siempre con las colonias hacia arriba, a temperatura ambiente.

-Se calentó en un horno de vacío durante 2 horas a 80°C, para que el DNA quede fijado a la nitrocelulosa.

Una vez obtenida la sonda marcada y el DNA pegado a la nitrocelulosa, se procedió a hibridar usando el siguiente protocolo:

-Se colocaron los filtros de nitrocelulosa con las colonias lisadas y horneadas, en una bolsa de polietileno, y se sellaron todos los bordes.

-Se agregó, cortando un extremo de la bolsa, 2X SSC hasta humedecer los filtros. Luego se volcó el 2X SSC.

-Se agregó buffer de hibridación (50% formamida, 0,5% Nonidet P40, 100 µg/ml tRNA). Se selló el extremo de la bolsa y se prehibridó 1 hora sumegiendola en un baño de agua a 42°C

-Se cortó uno de los extremos de la bolsa y se agregó 25 µl de la sonda desnaturalizada (previamente hervida en baño maría durante 5 min y enfriada en baño de hielo).

-Se incubó de 12 a 16 horas a 42°C para permitir la hibridación de la sonda con el DNA de los plásmidos.

-Se cortó una esquina de la bolsa y se volcó en buffer de hibridación con la sonda.

-Los filtros fueron lavados durante 5 min con 200 ml de 1X SSC-0,1% SDS tres veces a temperatura ambiente y tres veces a 65°C.

-Los filtros de nitrocelulosa fueron envueltos en celofán y expuestos a placas radiográficas (X-Omat XAR, Kodak) durante toda la noche.

-Los clones que hibridaron fueron crecidos en LB antibiótico y guardados a 4°C.

2.14 MÉTODO DE SECUENCIACIÓN RÁPIDA DEL cDNA.

La secuenciación directa del RNA, utilizando enzimas o

degradación química (ver 1.9), es un método laborioso, es por ello que se han buscado alternativas que simplifican el procedimiento. Una técnica más sencilla y ampliamente utilizada es la secuenciación de cDNA sintetizado por la transcriptasa reversa al copiar el RNA cuya secuencia se desea conocer. Para ello se han adaptado a las particularidades del caso los métodos preexistentes de secuenciación de DNA: i) el degradativo (253) y ii) el de los terminadores de cadena (252).

En el método degradativo (264) se utiliza como iniciador a un oligonucleótido sintético complementario a alguna región del RNA, marcado radiactivamente en el extremo 5'. Se sintetiza cDNA a partir de un templado de RNA, obteniéndose moléculas marcadas radiactivamente en el extremo 5', que al ser degradadas químicamente permiten determinar la secuencia de cDNA complementaria al RNA.

En el método de los terminadores de cadena, también se utiliza un oligonucleótido sintético complementario a alguna secuencia del RNA cuya secuencia se desea conocer, pero en este caso se sintetiza cDNA en presencia de un nucleótido trifosfato marcado radiactivamente y un terminador de cadena (dideoxinucleótido trifosfato ó ddNTP). Al realizar 4 reacciones diferentes con cada una de los ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) se puede determinar la secuencia del cDNA.

Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores fueron producidos en un sintetizador automático Applied Biosystems Model 380 A, que utiliza el método de las fosforamiditas (155). Fueron cedidos gentilmente por el Dr. E. Domingo del centro de Biología Molecular, de la Universidad Autónoma de Madrid, y por el Dr. J. Alonso del Max Planck Institut, Alemania Federal.

El método utilizado es este trabajo fue el de los terminadores de cadena; se usó el siguiente protocolo:

-Se coprecipitaron 1 μg de RNA (ver 2.7) con 0.1 μg del oligonucleótido iniciador, agregando 2 volúmenes de etanol. Se congeló a -70°C , se centrifugó a 15.000 xg, se lavó el precipitado con etanol 70% y se secó con vacío.

-Se resuspendió en buffer 0,5X RT. Esta mezcla fue denominada RNA-primer.

5X RT

1 M Tris-HCl pH 8.3	50 µl
1 M MgCl ₂	10 µl
2 M KCl	25 µl
0,5 M DTT	20 µl
agua-DEP	75 µl

	200 µl

-Se resuspendieron 25 µCi de dATP alfa-³²P (3000 Ci/mmol, New England Nuclear), en dGATC (0,25 mM dGTP, 0,25 mM dCTP, 0,25 mM TTP y 10 mM dATP) y 5X RT. Esta mezcla fue denominada marca-RT.

-El RNA-primer fue fraccionado en 4 tubos, en los cuales se agregaron RNA-primer, marca-RT, 10 µM final de cada uno de los ddNTPs (excepto ddATP del cual se agregó 0,5 µM) y 2,5 unidades de transcriptasa reversa. Se incubó a 42°C durante 30 min..

-Se agregó a cada tubo 1 µl de 0,1 mM dATP y se continuó incubando a 42°C durante 15 min más.

-Se liofilizaron las reacciones y se resuspendieron en 4 µl de dd-colorantes.

dd-colorantes

Formamida desionizada (IBI)	100 ml
xilencianol (Biorad)	0,1 g
azul de bromofenol (Biorad)	0,1 g
0,5 M EDTA	2 ml

-Se corrieron geles de acrilamida 6 % utilizando el sistema de gradiente de concentración de buffer con el objeto de poder leer más secuencias por gel de lo que se leería utilizando geles lineales. Los geles fueron armados de la siguiente forma:

1) Se utilizaron platos de vidrio de 25 cm x 60 cm, y espaciadores de 0,4 mm, entre los cuales se volcó en gel.

2) Se tomaron 15 ml de mezcla 5X y se agregaron 30 µl de 10% persulfato de amonio y 30 µl de TEMED (BRL).

Mezcla 5X

40% acrilamida (BRL)	37,5 ml
N,N' Metilenbisacrilamida	0,75 g
10X TBE	113,5 ml
urea (Int. Biotech., Inc.)	115 g
sacarosa (Sigma Chem. Co.)	12,5 g
azul de bromofenol	12,5 mg
agua bidestilada c.s.p.	250 ml

3) Se tomaron 100 ml de 0,5X mezcla y se agregaron 200 μ l de 10% persulfato de amonio y 200 μ l de TEMED.

Mezcla 0.5X

40% acrilamida	37,5 ml
2% N,N' Metilenbisacrilamida	37,5 ml
10X TBE	12,5 ml
urea	115 g
agua bidestilada c.s.p.	250 ml

4) En una pipeta de 25 ml se tomaron 15 ml de la mezcla del punto 3, y luego 15 ml de la mezcla del punto 2. Se dejaron pasar 6 burbujas de aire con el objeto de distorcionar la interfase entre las mezclas 5X y 0,5X, y así formar un gradiente de concentración.

5) Se volcó el gradiente del punto 4, y luego se completó el volumen del gel con mezcla 0,5X.

6) Se dejó polimerizar durante 1 hora. Se recorrió durante 30 min, luego de lo cual se sembraron las muestras. La electroforesis se desarrolló a 2.000 V y aproximadamente 30 mA, hasta que el xilencianol migró 45 cm desde el origen de siembra.

7) Se fijó el gel con 10% metanol-10% ácido acético durante 15 min y se secó antes de exponerlo a autorradiografía.

2.15 RECLONADO DE FRAGMENTOS EN EL PLÁSMIDO pSP64.

El plásmido pSP64 fue desarrollado por Melton et al. (247), posee un promotor para la RNA polimerasa DNA dependiente del bacteriofago SP6 y un conjunto de sitios de restricción únicos uno al lado del otro, denominado polylinker, que sirve para clonar

fragmentos que se desean transcribir.

En este trabajo se reclonaron fragmentos de cDNA en el plásmido pSP64 con el objeto de agregar sitios de restricción en los extremos de los fragmentos (reclonado en el polylinker). Esto permitió facilitar el ulterior manejo de los insertos para: i) marcar selectivamente uno de los extremos con ^{32}P para poder secuenciarlo (ver 2.14), ii) producir sondas de RNA de alta actividad específica y iii) clonar estos fragmentos en fase en vectores de expresión de proteínas para *E. coli*. La obtención de sondas de RNA como la expresión de proteínas son tareas realizadas en el laboratorio pero no forman parte de esta tesis, por lo tanto no serán descriptas aquí.

Para el reclonado de fragmentos de cDNA en pSP64 se utilizó el siguiente protocolo:

-Se digirió el plásmido con el inserto de cDNA que se deseaba reclonar con Pst I. Generalmente se partió de 10 μg de DNA y 10 unidades de enzima.

-Se purificó el inserto de cDNA mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% de bajo punto de fusión, extrayéndose el DNA en forma similar a la descrita en 2.9.5.

-Se digirió el plásmido pSP64 con Pst I. Luego de incubar 5 μg de DNA plasmídico con 10 unidades de la enzima Pst I durante 2 horas a 37°C, se agregaron 12,5 unidades de fosfatasa alcalina (25 unidades/ μl , CIP, Boehringer Mannheim). Se dejó incubar toda la noche a 37°C. Se purificó la forma lineal del plásmido a través de un gel de agarosa 0,8% de bajo punto de fusión (ver 2.9.5).

-Se ligaron cantidades equimoleculares de inserto con vector. En 10 μl de volumen final de reacción se utilizó 0.5 μl de T_4 DNA ligasa (1 unidad/ μl , New England Biolabs) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Se dejó incubando 12 horas a 16°C.

-Se transformaron células DH1 con 1 μl de la mezcla de ligado (ver 2.9.6) y se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina.

-Se picaron 12 colonias amp^{r} y se hicieron minipreparados, los cuales fueron digeridos con la enzima Pst I y analizados por electroforesis en geles de agarosa 0,8% (ver 2.10). Así se seleccionó

el clon con el inserto deseado.

-Este clon fue crecido en medio LB con ampicilina, y se purificó el plasmido mediante el método descrito en el punto 2.11.

2.16 MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS EUCARIOTAS Y BACTERIAS.

2.16.1 Medio MEM.

El medio mínimo esencial de Eagle, modificado por Dulbecco (290,291) fue preparado siguiendo la formulación GIBCO, cat # 21. Como antibiótico se utilizó 50 µg/ml de gentamicina. El medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO).

2.16.2 Medio MEM sin fosfato.

Este medio fue utilizado para la preparación de virus marcado radiactivamente con ^{32}P -fosfato. Se preparó en forma análoga al MEM con omisión de fosfato inorgánico.

2.16.3 Medio LB.

Las bacterias se crecieron en medio LB (243) cuya composición fue: 10 g/l de bactotripton (DIFCO), 5 g/l de extracto de levadura (DIFCO) y 10 g/l de NaCl (Merck). Para medio sólido (LB-agar) se añadió 15 g/l de agar (DIFCO). Los medios fueron esterilizados autoclavandolos.

De acuerdo al tipo de plásmido utilizado, el LB fue suplementado con 15 µg/ml de tetraciclina (Sigma Chem. Co.) o 50 µg/ml de ampicilina (Sigma Chem. Co.).

Para amplificar el número de copias de plásmido por bacteria se utilizó 125 µg/ml de cloranfenicol (Sigma Chem. Co.).

2.17 TAMPONES.

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes tampones:

NET: 10mM Tris-HCl pH7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA.

TE: 10 mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA.

IBE: 89 mM Tris-borato pH8,3; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA.

TAE: 40 mM Tris-Acetato pH8,0; 2 mM EDTA.

Tfb I: 30 mM acetato de potasio; 10 mM KCl; 10 mM CaCl; 50 mM MnCl₂; 15% glicerol. Llevado a pH5,8 con ácido acético.

Tfb II: 10 mM PIPES (Sigma Chem. Co.); 75 mM CaCl; 10 mM KCl; 15% glicerol, llevado a pH6,5 con KOH.

BT: 0,07% Tritón X100 (Sigma Chem. Co.); 40 mM EDTA; 39 mM Tris-HCl pH7,5.

SSC: 15 mM citrato de sodio; 150 mM NaCl; pH7.0

Buffer alcalino: 30 mM NaOH; 5 mM EDTA.

2.18. OTROS MATERIALES.

Los productos cuya marca no se detalla fueron adquiridos en la casa Merck o similar, y son de grado p.a..

El Papel de nitrocelulosa utilizado pertenece a la casa Millipore.

La rápida evolución que presenta el VFA lo convierte en un interesante modelo para el estudio de la variabilidad viral.

Cualquier ventaja replicativa aparecida en una cepa determinada producirá el predominio de esta sobre las otras poblaciones virales (ver 1.1 a 1.6), y es por ello que en la naturaleza aparecen nuevas variantes permanentemente.

Las mutaciones producidas en el genoma del VFA son seleccionadas por alguna de las innumerables presiones ejercidas por el sistema, cuya consecuencia es la aparición de variantes con ventajas en alguna parte del ciclo de vida del virus. Probablemente son dos las presiones predominantes que lideran la aparición de variantes antigénicas observadas en el campo: i) la determinada por el sistema inmune, y ii) la determinada por la célula huésped.

La aparición de cepas capaces de evadir el sistema inmune y que provocan las constantes rupturas de inmunidad en regiones donde la enfermedad es endémica, son la respuesta del virus a la presión que ejerce el sistema inmune sobre el mismo, seleccionando nuevas variantes que se generan por deriva antigénica o por salto antigénico (ver 1.4 a 1.6).

El amplio rango de huéspedes que presenta el VFA es otro de los factores que sin lugar a dudas genera variabilidad (ver 1.8.9). La selección de nuevas variantes no sólo se produce al infectar distintos huéspedes, sino también dentro de los diferentes tejidos de un mismo huésped. Este mecanismo de variación, a pesar de haber sido ampliamente identificado, es menos claro que el mediado por el sistema inmune (ver 1.8.9).

En la presente Tesis hemos elegido como modelo para la inducción de la variabilidad mediada por la célula huésped a pasajes seriados por distintos sistemas celulares de una población homogénea obtenida por clonado de la cepa C₃ Resende del VFA. Para ello se analizaron las distintas poblaciones virales provenientes de los diferentes sistemas celulares empleados. La ausencia de anticuerpos en este modelo permite descartar la acción del sistema inmune en este estudio, y por

lo tanto las variaciones aparecidas son debidas exclusivamente al libre accionar del virus con la célula hoesped.

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES VIRALES OBTENIDAS POR PASAJES SERIADOS DE LA CEPA C₃ RESENDE DEL VFA.

Un clon de la cepa C₃ Resende del VFA denominado C3 clon, fue obtenido mediante tres purificaciones en placa (ver 2.3). Un sotck de este clon fue utilizado como inóculo inicial para infectar dos líneas celulares (BHK-21 e IBRS-2) y dos cultivos primarios (TFB y RFB).

El C3 clon proviene de una sola partícula viral original, y por ende todas las variantes que aparezcan se deberán exclusivamente a mutaciones ocurridas en ese "molde" genómico inicial.

Los pasajes seriados en cada uno de los distintos sistemas celulares utilizados (ver 2.4), dieron origen a poblaciones virales con características propias, que fueron comparadas con las del C3 clon que les dió origen.

3.1.1 Tiempo en que se produce el efecto citopático total.

El tiempo en que una población viral es capaz de producir efecto citopático en todas las células de un cultivo, especialmente si las características del cultivo y de la infección se mantienen constantes, es una característica que depende de la interacción virus-célula. Se registraron ios tiempos requeridos para que se produjera efecto citopático en las células del cultivo (efecto citopático total). La morfología celular fue inspeccionada por micsocopia durante la infección, para determinar cuando se producía el efecto citopático en el 80% de las células del cultivo (efecto citopático total o cpe total).

Como las infecciones se realizaron con multiplicidades de infección entre 1 y 10, las variaciones en el tiempo en que se produjo el efecto citopático total no se deben a cambios

en el número de partículas infectantes por célula, reflejando así la duración de un solo ciclo de replicación viral.

En la figura 2 se encuentran graficados los tiempos de efecto citopático total para los pasajes seriados por los cultivos primarios de TFB y RFB, tomados desde el momento de la infección. En los dos primeros pasajes por RFB el c.p.e. total se produce a las 48 y 24 horas respectivamente. Este largo lapso que necesita el virus para producir c.p.e. en las células de RFB, no puede ser debido a la baja m.o.i., ya que las infecciones se realizaron con altas m.o.i. (ver 2.4). Por lo tanto se trata de una característica poblacional del C3 clon, que podría ser explicada tomando en cuenta que este virus fue obtenido por clonado en células BHK-21 y por ende se encuentra adaptado a multiplicar en ese sistema celular. En el pasaje RFB 03 el c.p.e. total que se produce a las 12 horas llevaría a pensar que el virus se ha "adaptado" a crecer en células de RFB, seleccionándose poblaciones virales capaces de multiplicar más eficientemente en este sistema celular. En los tres primeros pasajes por células de TFB no se observó efecto citopático por 96 horas, por lo tanto se realizaron pasajes ciegos cada 24 horas; en el cuarto pasaje se produjo un 60% de efecto citopático, y en el quinto pasaje se produjo efecto citopático total a las 22 horas post-infección. Este efecto podría ser análogo al observado en los dos primeros pasajes por RFB, representando también la "adaptación" del virus a multiplicar en un nuevo sistema celular.

La "adaptación" del virus al sistema huésped probablemente se produce dentro de los primeros 5 pasajes por células de TFB y RFB, donde se observa una tendencia a disminuir el tiempo en que se produce el c.p.e. total. Entre los pasajes 5 y 10 se observa un período de variación en el c.p.e. total, para luego estabilizarse entre los pasajes 10 y 20.

En la figura 3 se encuentran graficados los tiempos de efecto citopático total para los pasajes seriados por las líneas celulares BHK-21 e IBRS-2. En contraste con lo observado en

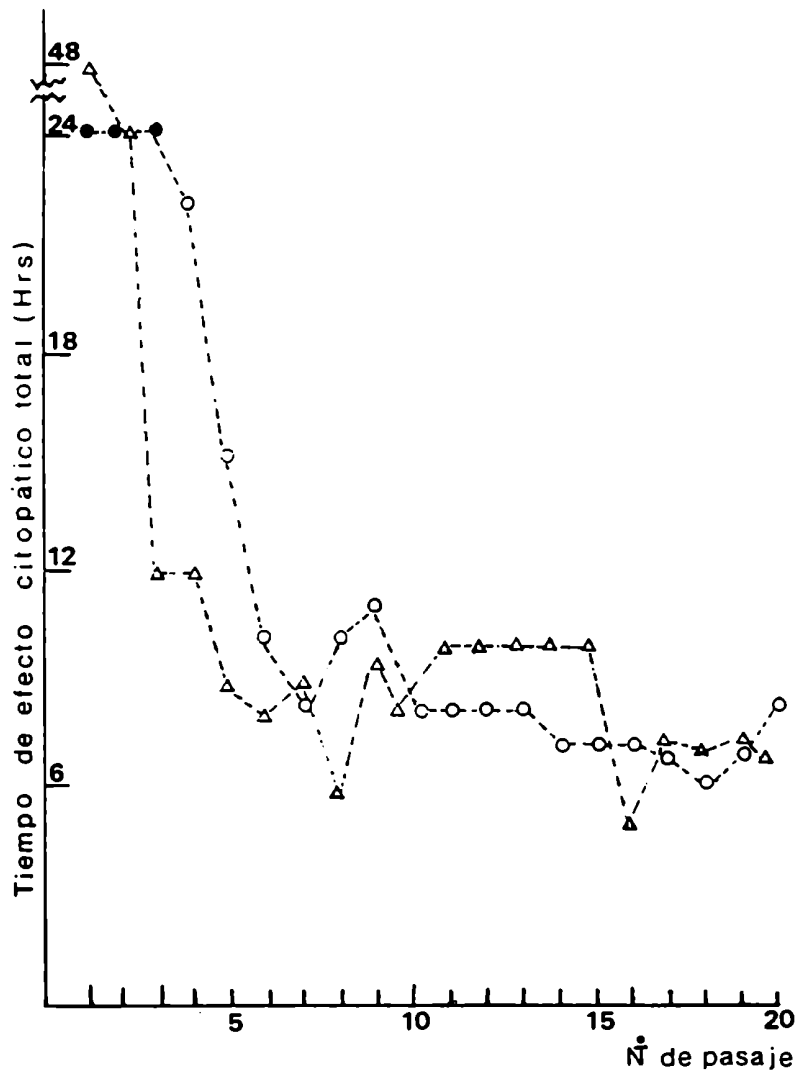


FIGURA 2. Tiempo en que se produce el c.p.e. total en los pasajes seriados del C3 clon por cultivos primarios de TFB y RFB.

Tiempos en que se produce el efecto citopático total en los pasajes seriados por RFB (Δ-Δ) y por TFB (O-O). Pasajes ciegos cada 24 horas por células de TFB (●-●).

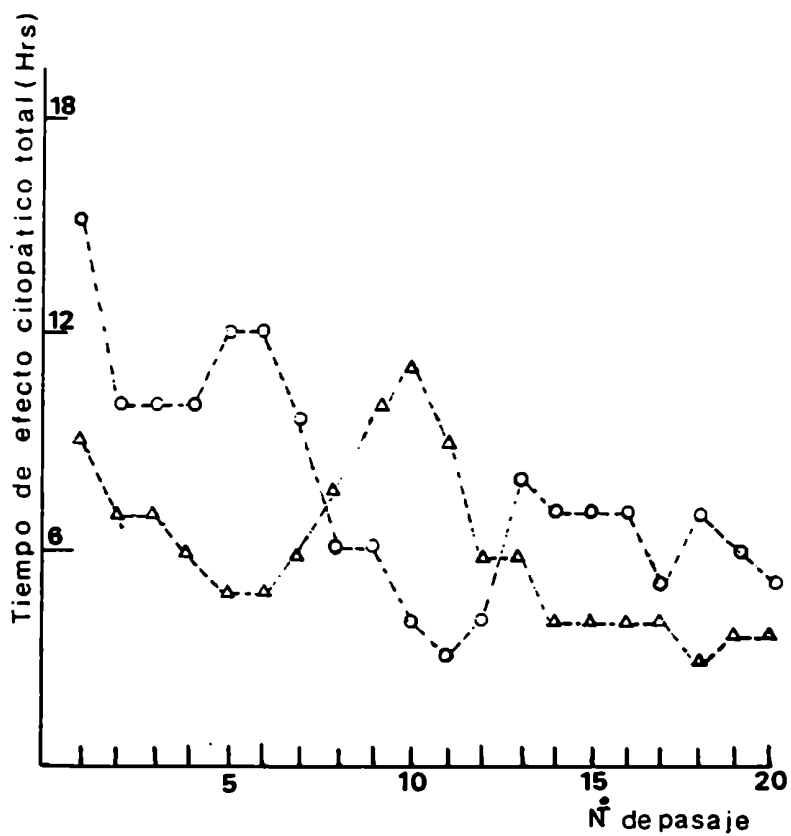


FIGURA 3. Tiempo en que se produce el c.p.e. total en los pasajes seriados del C3 clon por las líneas celulares BHK-21 e IBRS2.

Tiempos en que se produce el efecto citopático total en los pasajes seriados por BHK-21 (O-O) y por IBRS-2 (Δ-Δ).

los cultivos primarios de TFB y RFB, no se produce una drástica disminución de estos tiempos en los primeros 5 pasajes. Entre los pasajes 5 y 15 se produce una amplia variación del tiempo del c.p.e. total, para finalmente estabilizarse alrededor del pasaje 15.

Durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares se observaron cambios en el comportamiento de las poblaciones virales en cuanto al tiempo en que se produce el efecto citopático total. Estos cambios dependieron del sistema celular utilizado, pero siempre condujeron a la selección de poblaciones capaces de producir c.p.e. en menor tiempo que el necesario para que el C3 clon (o los primeros pasajes) lo produjera.

El acortamiento del tiempo necesario para que se complete el ciclo de infección viral, actuaría como una ventaja selectiva que determinaría el sentido de la evolución de la población viral, provocando la estabilización del sistema en los últimos pasajes seriados.

3.1.2 Infectividad para células de RFB y BHK-21.

Otro de los parámetros tomados en cuenta para la caracterización de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares, fue la capacidad de infectar células BHK-21 y RFB. Para ello los sobrenadantes de los pasajes 1, 5, 15 y 20 de cada sistema celular fue titulado simultáneamente en microplacas que contenían monocapas de células BHK-21 o RFB (ver 2.5.1).

En la tabla 7 se observan los promedios de tres titulaciones en células BHK-21 y RFB. Diferencias de infectividad menores de 1,5 log entre los dos sistemas celulares, para un mismo virus proveniente de un pasaje determinado, no fueron tomadas en cuenta como características poblacionales diferentes. Este criterio se estableció teniendo en cuenta el error del método de titulación y para asegurar que realmente se tratara de

TABLA 7. Infectividad en células BHK-21 y RFB del virus producido durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares.

SISTEMA CELULAR	N°DE PASAJE	INFECTIVIDAD#	
		BHK-21	RFB
BHK-21	1	7,2	7,2
	5	6	6,7
	10	6,2	6,5
	15	7,2	7,5
	20	7,5	7,2
IBRS-2	1	6	6,7
	5	6	6,3
	10	5,5	6,3
	15	6	6,2
	20	4	6,2
RFB	1	6	6,3
	5	6,3	6,5
	10	7,5	7,3
	15	7,5	7,5
	20	7,5	7
TFB	1	6,5	6,5
	5	6,5	6,3
	10	7	7
	15	6,5	6,5
	20	7	6,5

#: log DICT50/ml.

variaciones poblacionales. Sólo en el pasaje 20 por células IBRS-2 se observó una infectividad menor para células BHH-21 que para RFB. Para corroborar esta disminución en la infectividad se titularon los pasajes IBRS 19 e IBRS 21 en ambos sistemas celulares, estableciéndose que la diferencia en los títulos era semejante a la observada en el pasaje IBRS 20 y del orden de 2 log.

A excepción de la población viral proveniente de los pasajes seriados por células IBRS-2, el resto de las poblaciones virales obtenidas por los pasajes en los otros sistemas celulares no presentaron diferencias en la infectividad para células BHK-21 y RFB. Por lo tanto bajo este parámetro de medición de variabilidad, la población viral obtenida en alrededor de 20 pasajes por células IBRS-2, es distinta de la población inicial.

3.1.3 Patogenicidad para ratón lactante.

Otro marcador genético considerado para medir la variabilidad viral fue la capacidad de las poblaciones virales de matar ratones lactantes (ver 2.5.2).

Para ello se tomaron los sobrenadantes de los mismos pasajes 1, 5, 10, 15 y 20 titulados en células de RFB y BHK-21, y se los tituló en ratones lactantes. En la tabla 8 se detallan los títulos de cada uno de los pasajes por los distintos sistemas celulares. Cada uno de los valores representa el promedio de 3 titulaciones distintas. En los casos en que se encontraron diferencias de títulos mayores que 1,5 log entre la patogenicidad para ratón lactante y la infectividad para células de RFB, se titularon el pasaje anterior y el posterior al mismo. Esto permitió confirmar la existencia de atenuación en la patogenicidad para ratón lactante.

En el pasaje 15 por células BHK-21 se observó una disminución en el título obtenido en ratones lactantes en relación al obtenido en células RFB. Esta atenuación de alrededor de 2 log se mantiene durante los subsiguientes pasajes, como

TABLA 8. Patogenicidad para ratón lactante (RL).

SISTEMA CELULAR	N° DE PASAJE	TÍTULO EN RL#	RELACIÓN RFB/RL*	CARACTERÍSTICA@
BHK-21	1	7,5	-0,3	salvaje
	5	6,8	-0,1	salvaje
	10	5,7	0,8	salvaje
	15	6	1,5	atenuado para RL
	20	5,5	1,7	atenuado para RL
IBRS-2	1	7,8	1,1	salvaje
	5	5,7	0,6	salvaje
	10	5,8	0,5	salvaje
	15	5	1,2	salvaje
	20	7	-0,8	salvaje
RFB	1	6	0,3	salvaje
	5	6,7	-0,2	salvaje
	10	8	-0,7	salvaje
	15	6,5	1	salvaje
	20	6	1	salvaje
TFB	1	5,7	0,8	salvaje
	5	6,5	-0,2	salvaje
	10	4,7	2,3	atenuado para RL
	15	4,5	2	atenuado para RL
	20	5	1,5	atenuado para RL

#: log DL50/ml.

*: (log DICT50/ml en RFB) / (log DL50/ml en RL).

@: Se tomó la siguiente convención:

Si la relación RFB/RL \leq 1,5 se considera población salvaje.

Si la relación RFB/RL \geq 1,5 se considera población atenuada

queda establecido en el pasaje BHK 20 (ver tabla 8).

El pasaje 10 por células de TFB se comportó como atenuado en cuanto a la patogenicidad para ratón lactante. Esta característica se mantiene en los pasajes subsiguientes como queda establecido al titular el pasaje TFB 20.

La patogenicidad para ratón lactante se comportó como un marcador genético muy útil para determinar la variabilidad viral inducida por el sistema celular, pues mediante el mismo fue posible establecer cambios en las características de las poblaciones obtenidas mediante los pasajes seriados por células BHK-21 y TFB. Estos cambios drásticos (disminución de 2 log en los títulos para ratón lactante) que se produjeron en muy pocos pasajes por dos sistemas celulares distintos, se deben probablemente a mutaciones distintas que confieren un fenotipo semejante, ya que aparecieron independientemente una de la otra.

3.1.4 Masa de viriones producida durante la infección.

La productividad viral durante la infección puede ser medida cuantificando la masa de partículas sintetizadas. Esta característica de la interacción virus-célula, puede ser tomada como parámetro de variación en la evolución de las poblaciones virales. Para ello se infectaron 5 botellas rodantes conteniendo monocapas confluentes de los distintos sistemas celulares para obtener virus de los pasajes 5 y 15 de los respectivos cultivos de células y purificar viriones según el punto 2.6.

En la figura 4 se encuentran graficados los picos de absorbancia a 260 nm correspondientes a partículas 140S obtenidas en los gradientes de sacarosa. En la tabla 9 se comparan las masas de partículas virales obtenidas por integración de los picos de la figura 4. Como puede observarse, existe una tendencia generalizada en todos los sistemas celulares de producir un menor número de partículas 140S al aumentar el número de pasajes. La masa de viriones necesaria para producir una DICT50 es menor al aumentar el número de pasajes (Tabla 9). Por lo tanto la

FIGURA 4. Purificación de partículas 140 S de poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por distintos sistemas celulares.

Las partículas 140 S fueron purificadas por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 5-30%. Los picos de viriones fueron ubicados por absorbancia a 260 nm de las distintas fracciones del gradiente (N° 1 corresponde al fondo del gradiente).

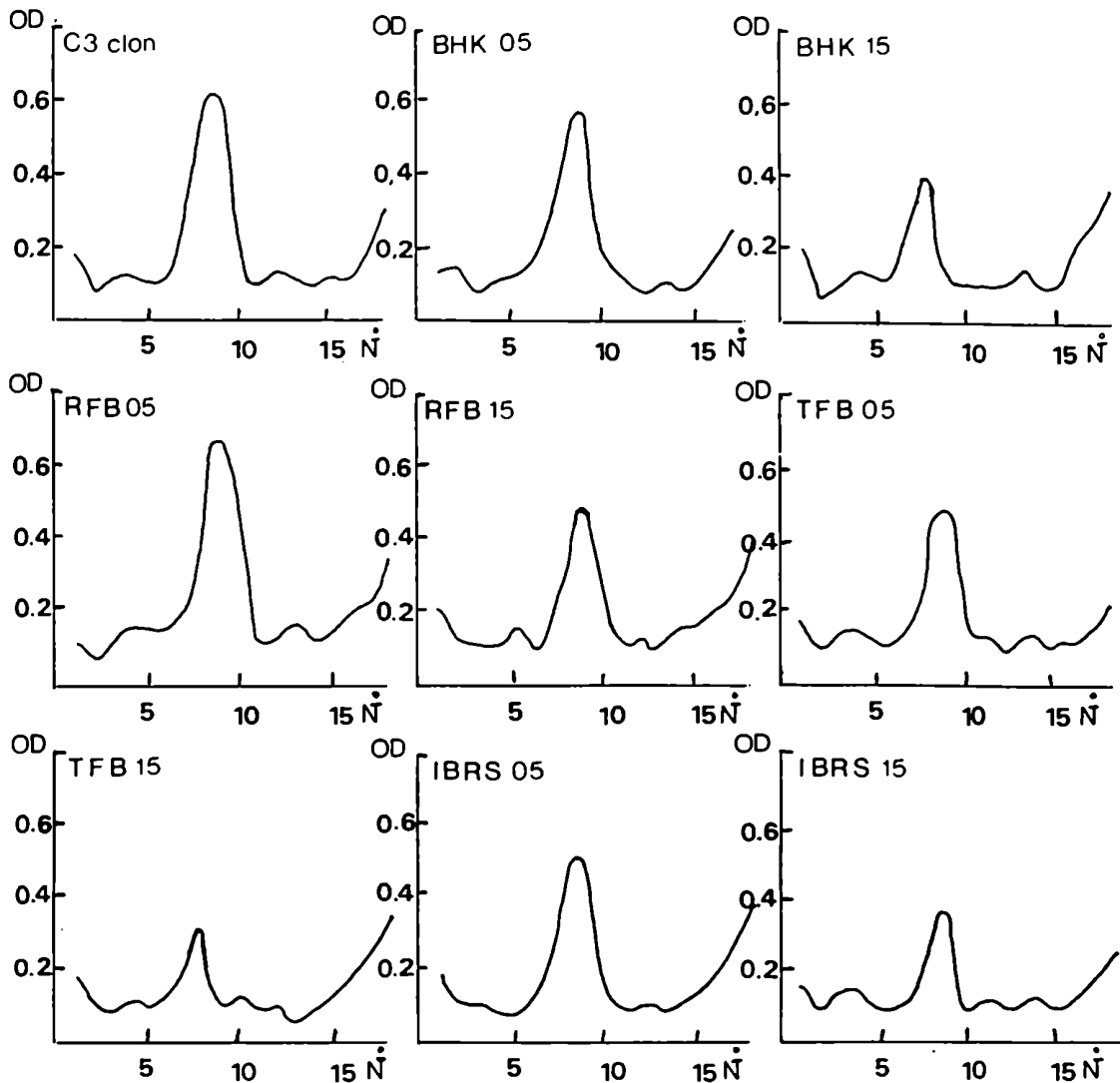


Tabla 9. Infectividad específica de las poblaciones virales provenientes de los pasajes 5 y 15 por los distintos sistemas celulares.

Las masas de los viriones producidos en los pasajes 5 y 15 por los distintos sistemas celulares, fueron obtenidas por integración de los picos 140 S de la figura 4.

SISTEMA CELULAR	NÚMERO DE PASAJE	MASA DE VIRIONES#	<u>INFECTIVIDAD ESPECÍFICA</u>	
			MASA/BHK*	MASA/RFB@
BHK-21	C3 clon	79,6	11,05	11,05
BHK-21	5	94,7	15,78	14,13
BHK-21	15	46,1	6,40	6,14
RFB	5	84,2	13,36	12,95
RFB	15	48,7	6,49	6,49
TFB	5	46,2	7,10	7,33
TFB	15	27,6	4,24	4,24
IBRS2	5	89,5	14,91	14,20
IBRS2	15	28,9	4,81	4,66

#: masas calculadas en μg tomando $E_{260}^{260} = 76$ (69).

*: Masa de viriones/ \log DICT50.ml⁻¹ en células BHK-21.

@: Masa de viriones/ \log DICT50.ml⁻¹ en células RFB.

infectividad específica de las poblaciones virales encontradas en los pasajes 15 de los distintos sistemas celulares es mayor que la observada en los pasajes 5. Esto sugiere que se produjo la selección de poblaciones con ventajas replicativas, cuya característica fue la de producir un mayor número de partículas infectivas por masa total de partículas.

Se establece una vez más, tomando en cuenta este parámetro, la rápida evolución de las poblaciones virales obtenidas durante los pocos pasajes seriados por los distintos sistemas celulares, en las condiciones y m.o.i. adoptadas en este trabajo. Además, la disminución en el tiempo de efecto citopático total (ver 3.1.1) y la tendencia a producir menor número de partículas virales, sugieren la aparente selección por la célula huésped de aquellas poblaciones virales capaces de producir un rápido efecto citopático con el menor número de partículas virales posibles.

3.2 ANÁLISIS DEL GENOMA DE LAS POBLACIONES VIRALES OBTENIDAS DURANTE LOS PASAJES SERIADOS DEL C3 CLON POR LOS DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.

Con el objeto de analizar en forma rápida y general el genoma de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares, se optó por utilizar el análisis bidimensional de los oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1. Este método ampliamente difundido en el análisis de variantes virales tales como cepas atenuadas (287,288), variantes antigénicas (227), etc, solo permite analizar alrededor de un 7% del genoma viral (43) especialmente las variaciones en aquellos oligonucleótidos más grandes (resistentes a la RNasa). La información aportada por esta técnica es parcial, sin embargo los mapas se generan rápida y sencillamente obteniéndose información sobre todo el genoma. Es por ello que fue utilizado en el análisis de las poblaciones virales caracterizadas

previamente en el punto 3.1.

3.2.1 Análisis del genoma de las poblaciones virales no segregadas.

Las poblaciones virales de los pasajes 5 y 15 por células de TFB, RFB, BHK-21 e IBRS-2 fueron sometidas al análisis bidimensional de oligonucleótidos. Para ello se utilizaron los métodos de obtención de oligonucleótidos marcados "in vitro" (ver 2.8.1) y de RNA inducido (ver 2.8.2). Se realizaron dos análisis independientes por cada uno de los métodos utilizados (4 mapas de oligonucleótidos resistentes a RNasa T1 por cada pasaje viral analizado). En caso de aparición de oligonucleótidos espúreos, la presencia real de los mismos en los mapas fue confirmada o desechada comparando las 4 repeticiones de cada uno de las poblaciones virales analizadas.

En la figura 5 se observan los mapas de oligonucleótidos de los pasajes 5 y 15 por los cultivos primarios de TFB y RFB, como también el mapa correspondiente al C3 clon.

En la figura 6 pueden observarse los mapas de oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1 obtenidos de los pasajes 5 y 15 por las líneas celulares BHK-21 e IBRS-2.

Debido a que no existieron mayores diferencias entre los mapas de oligonucleótidos realizados por los dos métodos antes enunciados, se muestran indistintamente los obtenidos por uno u otro método.

Al comparar los mapas de oligonucleótidos pudo establecerse que a pesar de las diferencias en el comportamiento de las poblaciones virales analizadas en el punto 3.1, no se manifiestan cambios en los mapas de oligonucleótidos.

3.2.2 Análisis de la población viral obtenida en el pasaje BHK 15 , mediante segregación por clonado de las subpoblaciones.

La gran estabilidad de los mapas genómicos contrasta con las diferencias fenotípicas observadas durante los pasajes seriados

FIGURA 5. Mapas bidimensionales de oligonucleótidos de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por cultivos primarios.

Mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1, de los virus obtenidos en los pasajes RFB 05 (a), RFB 15 (b), TFB 05 (c) y TFB 15 (d). Además se presenta el mapa del C3 clon (e).

a)



b)



c)



d)



e)



FIGURA 6. Mapas bidimensionales de oligonucleótidos de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por líneas celulares.

Mapas bidimensionales de los oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1, de los virus obtenidos en los pasajes BHK 05 (a), BHK 15 (b), IBRS 05 (c) e IBRS 15 (d).

a)



b)



c)



d)



por los distintos sistemas celulares. Entonces, cabría preguntarse si el C3 clon posee un fenotipo antimutador y por ende si los cambios que se produjeron en el comportamiento de las distintas poblaciones derivadas del mismo se deben a la generación de partículas DI, a alguna otra característica intrínseca del C3 clon o a la generación de variantes. Para analizar estas posibilidades se optó por segregar las variantes de una de las poblaciones virales obtenidas por pasajes seriados. Esto se hizo con el objeto de encontrar variantes en los mapas genómicos, que por ser minoritarias no se manifestaron en los mapas de la población en general, y así aclarar la hipótesis antes planteada. Se tomó como ejemplo la población viral proveniente del pasaje BHK 15, pues esta presentó un fenotipo atenuado para ratón lactante, y además un número suficiente de ciclos de multiplicación durante los cuales cabría esperarse que, además de la población viral atenuada, se hubiera producido algún otro cambio manifestable en los mapas de oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1. Se utilizó el procedimiento del punto 2.3. De las 10 clonas diferentes obtenidas se eligieron 3, al azar, de las cuales se obtuvieron los mapas de oligonucleótidos resistentes a RNasa T1. Se analizaron las mismas características poblacionales que en el punto 3.1 estableciéndose que las tres clonas tienen el mismo fenotipo que la población del pasaje BHK15 (mantuvieron la característica de atenuación para la patogenicidad en ratones lactantes).

En la figura 7 pueden observarse los mapas bidimensionales de oligonucleótidos de las clonas B5, B7 y B9. En la clona B5 se manifestó un cambio, al aparecer un nuevo oligonucleótido. Esto sugiere que el C3 clon no posee un fenotipo antimutador, pues era de esperar que se produjeran algunas mutaciones que aparecieran en los mapas genómicos durante los 15 ciclos de replicación de este virus (50). Además esta mutación no se correlaciona con la atenuación para la patogenicidad en ratón lactante, que se debe probablemente a una mutación en alguna otra parte del genoma, y que como se vió en el punto 3.2.1, no se manifiesta en los mapas de oligonucleótidos. Por otro lado al

FIGURA 7. Mapas bidimensionales de oligonucleótidos de las clonas del pasaje BHK 15.

Mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1, de las clonas B5 (a), B7 (b) y B9 (c) obtenidas del pasaje BHK 15. La flecha indica el oligonucleótido diferente surgido en la clona B5.

a)



b)



c)



segregar las poblaciones por clonado, en condiciones de baja multiplicidad de infección, cabría esperar que tanto la generación de partículas DI, como su efecto de producir interferencia, quedaran minimizados. Por lo tanto los cambios en el comportamiento de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados se deberían al efecto de la célula huésped en la variabilidad celular, y no a algún otro fenómeno enmascarado por la metodología utilizada, ya que aparecieron otras mutaciones que sí se manifestaron en los mapas de oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1.

3.3 CLONADO MOLECULAR DEL GENOMA DEL VFA.

Estudios preliminares demostraron que los cambios en el serotipo A del VFA, inducidos por el sistema celular, están relacionados con mutaciones en la región hipervariable de VP1 (240,74).

Se utilizaron técnicas de DNA recombinante para determinar si los cambios en el comportamiento de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes por los distintos sistemas celulares se debían a cambios en la región hipervariable de la proteína VP1. La proteína VP1 además de ser antigénica y muy variable, forma parte del receptor viral que está involucrado en la adsorción a la célula huésped (284-286). Es por ello que es fundamental analizar esta región genómica en la que residen muchos de las mutaciones causantes de la variabilidad viral.

En el momento de comenzar este trabajo sólo se conocía el mapa de restricción del cDNA de la cepa O₁K del VFA (una de las primeras cepas clonadas). Es por ello que se adoptó la estrategia de clonar la cepa O₁ Campos (muy semejante a la O₁K) para luego analizar por restricción los clones obtenidos y determinar cuales contenían cDNA de regiones adyacentes a VP1. Estos clones de O₁ Campos fueron secuenciados, se determinó que realmente tenían cDNA correspondiente a VP1, y se los usó como sondas para obtener clones de la cepa C₃ Resende. Así se

obtuvieron plásmidos con insertos de cDNA de la región de VP1 del C3 clon, los cuales fueron secuenciados. A partir de las secuencias obtenidas se sintetizaron oligonucleótidos con el objeto de utilizarlos como iniciadores de la síntesis de cDNA necesaria para el métodos de secuenciación rápida (ver 2.14). De esta forma se conocieron las secuencias de la región hipervariable de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares.

3.3.1 Obtención de sondas de cDNA correspondientes a regiones adyacentes a la proteína VP1.

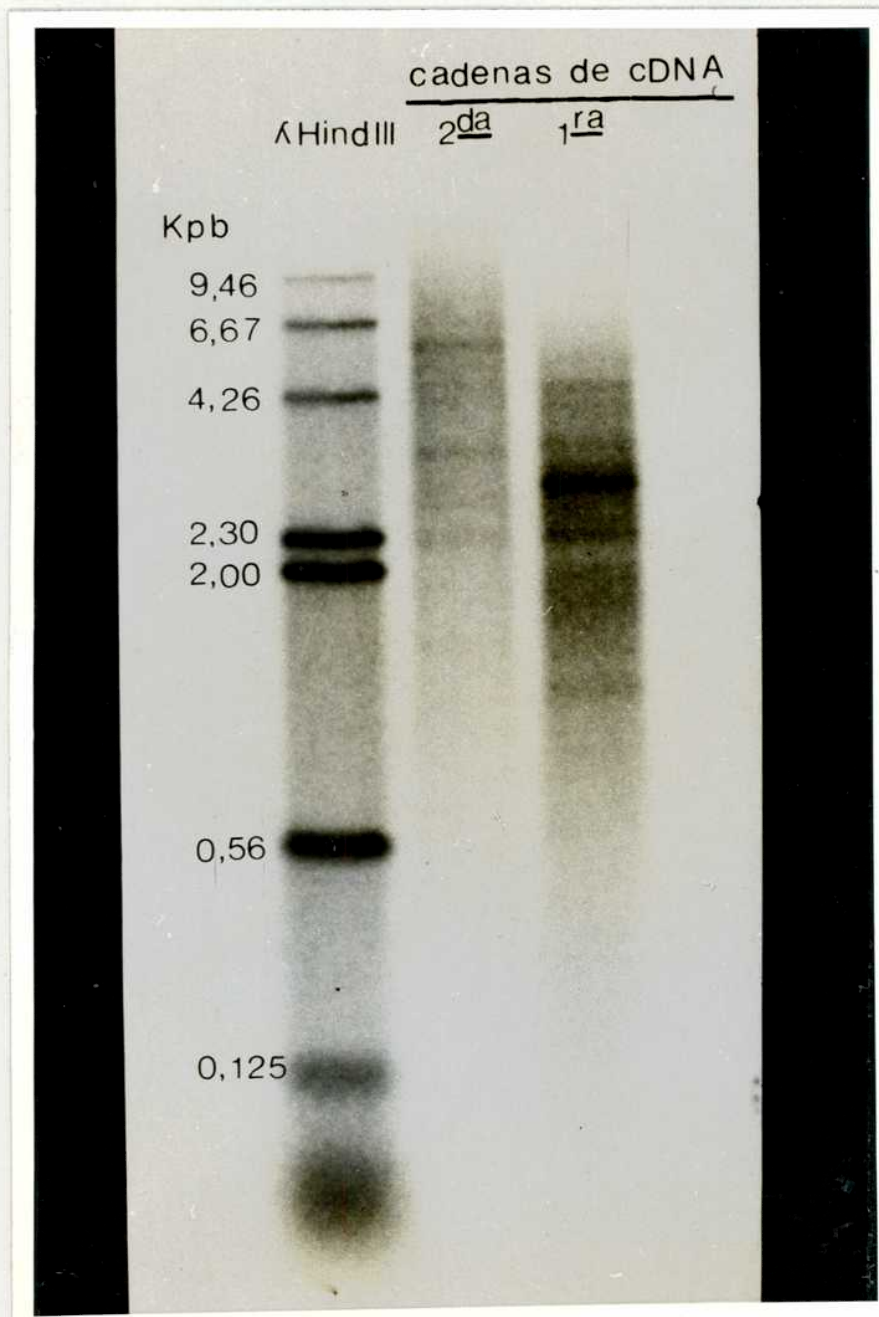
Se obtuvieron clones de cDNA de la cepa O₁ Campos del VFA a partir de RNA purificado de viriones producidos en células BHK-21. Se siguió el procedimiento descrito en el punto 2.9.

En la figura 8 se observa una autorradiografía de la primera y segunda cadena de cDNA (ver 2.9.1 y 2.9.2) de la cepa O₁ Campos del VFA. Estas fueron corridas en un gel de agarosa alcalina (ver 2.9.3), que al ser desnaturalizante permite separar moléculas de cDNA simple cadena según su peso molecular. Aunque la mayor parte de la primera cadena de cDNA corresponde a pesos moleculares distribuidos aproximadamente entre 2.000 a 4.000 bases, puede apreciarse material correspondiente a la longitud completa del genoma (8.300 bases) en la primera cadena, mientras que en la segunda cadena, y como era de esperar, se duplica el peso molecular del material obtenido en la síntesis de primera cadena.

El cDNA de doble cadena fue sometido a la acción de la nucleasa S1 con el objeto de eliminar el bucle de simple cadena que impide el clonado de estas moléculas. Para ello se tituló la concentración necesaria para que la enzima S1 hidrolizara solamente regiones de simple cadena y no de doble cadena (ver 2.9.3). En la figura 9 se observa la autorradiografía de un gel de agarosa alcalina en donde se corrieron las distintas fracciones de la titulación de S1. En el mismo se observa un

FIGURA 8. Análisis de la primera y segunda cadena de cDNA de la cepa O₁ Campos del VFA.

La primera y segunda cadena de cDNA sintetizadas a partir del RNA de la cepa O₁ Campos del VFA, fueron analizadas mediante electroforesis en gel de 1,5% agarosa alcalina (ver 2.9.2). Como marcadores de peso molecular se utilizaron fragmentos obtenidos por digestión del DNA del bacteriofago lambda con la enzima Hind III, marcados radiactivamente mediante el método de rellenado con DNA polimerasa I fragmento Klenow y dATP alfa-³²P (ver 2.12).



control de cDNA de doble cadena sin digerir con S1, y el cDNA sometido a digestión con distintas diluciones de la nucleasa S1 (entre 10^{-1} y 10^{-3}). En las primeras tres concentraciones de S1 se digirió prácticamente todo el cDNA, pero desde la concentración 10^{-2} en adelante se observa material que corresponde a cDNA de doble cadena sin digerir. Se optó por utilizar la dilución 10^{-3} de la nucleasa S1, pues la distribución del material resistente es semejante a la del cDNA de primera cadena (ver Figura 8). El resto del cDNA de doble cadena no utilizado en la titulación, fue digerido con la concentración 10^{-3} de la nucleasa S1 respetando las proporciones utilizadas en la titulación.

Al cDNA de doble cadena con ambos extremos libres, se le agregaron homopolímeros pegajosos (ver 2.9.4), y se lo anilló al plásmido pBR322 (ver 2.9.5). Con estos plásmidos (con insertos de cDNA del VFA), se transformaron *E. coli*. Se seleccionaron colonias resistentes a tetraciclina, originadas de bacterias que incorporaron los plásmidos. El 80% de las colonias fueron sensibles a la ampicilina (Amp^S) y resistentes a la tetraciclina (Tet^R) (el resto se trató de trazas del plásmido pBR322 no cortadas con la enzima Pst I). Los plásmidos de estas colonias, aproximadamente 100, fueron analizados por restricción (ver 2.9 y 2.10), digiriendo los minipreparados con las endonucleasas Bam HI, Hind III, Pst I y Bgl I.

En la figura 10 pueden observarse algunos de los plásmidos analizados por restricción. Tanto el clon 28 como el 29 poseen un sitio de corte para la enzima Hind III dentro del cDNA. Al digerirlos con esta enzima se observaron dos bandas debido a que el plásmido pBR322 posee un solo sitio de corte para esta enzima. En la figura 11 puede observarse el mapa previamente publicado de los sitios de restricción del cDNA de la cepa O₁K (162) en el cual se aprecian solo dos sitios de corte para la enzima Hind III, uno en P72 y el otro en P34 cerca de VP1. Es por ello que se secuenciaron por el método degradativo (ver

FIGURA 9. Titulación de la concentración de la nucleasa S1 necesaria para digerir el bucle de simple cadena del cDNA de doble cadena.

El cDNA de doble cadena fue digerido con distintas diluciones de la nucleasa S1 (ver 2.9.3). Las distintas alícuotas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de 1,5% agarosa alcalina. Como control se corrió cDNA de doble cadena sin digerir con la enzima S1. Los marcadores de peso molecular son fragmentos del bacteriofago lambda digeridos con la endonucleasa Hind III (ver figura 8).

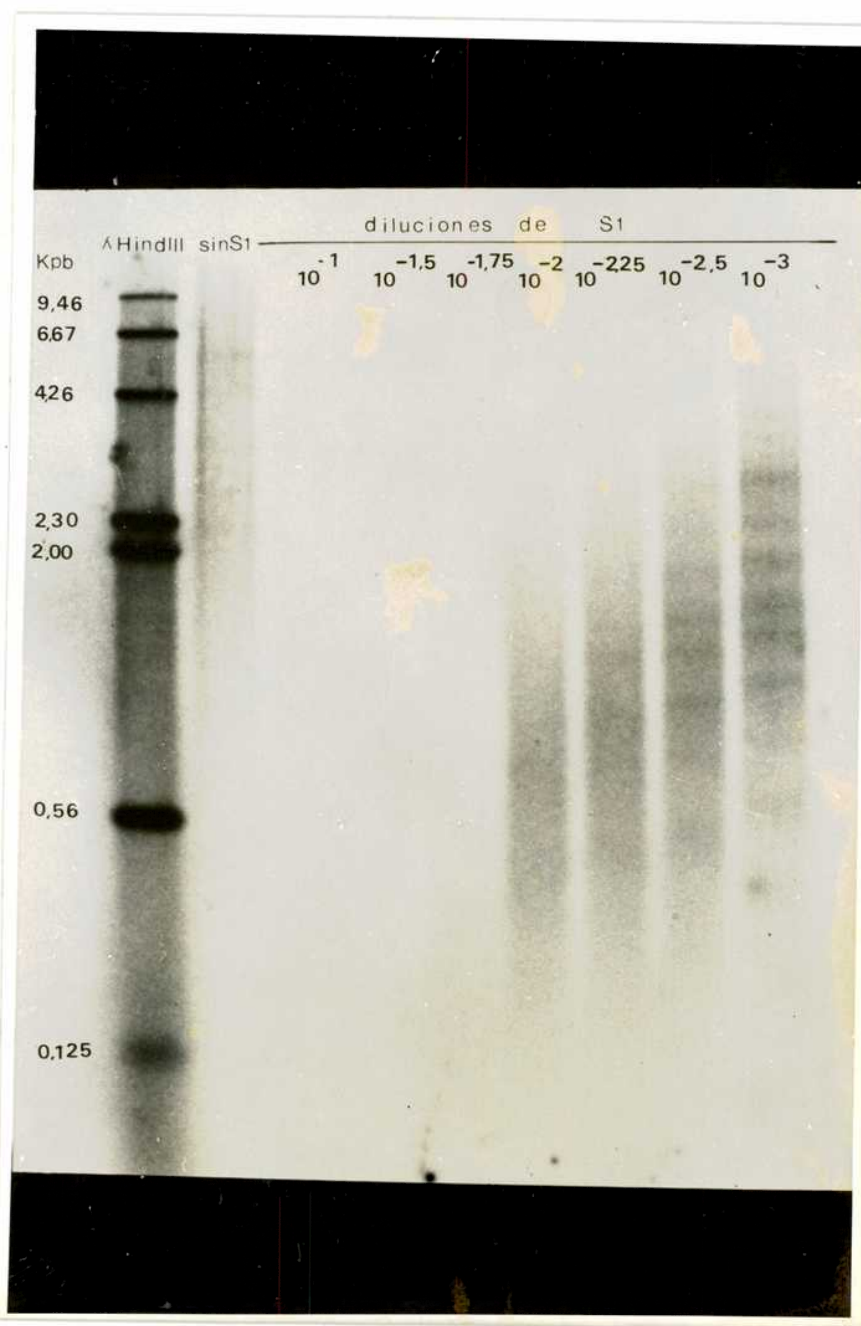


FIGURA 10. Análisis por restricción de los plásmidos obtenidos al clonar el cDNA de la cepa O₁ Campos del VFA.

Los minipreparados de plásmidos obtenidos al clonar la cepa O₁ Campos, fueron digeridos con enzimas de restricción (ver 2.10). Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 0,8% y teñidos con bromuro de etidio. Los clones Amp^S-Tet^R números 28,29,31,33,36,37 y 39, fueron restringidos con las enzimas Bam HI (B), Hind III (H), Pst I (P) y Bgl I (V). Como marcador de peso molecular se utilizó DNA del bacteriofago lambda digerido con Hind III (ver fig. 8).

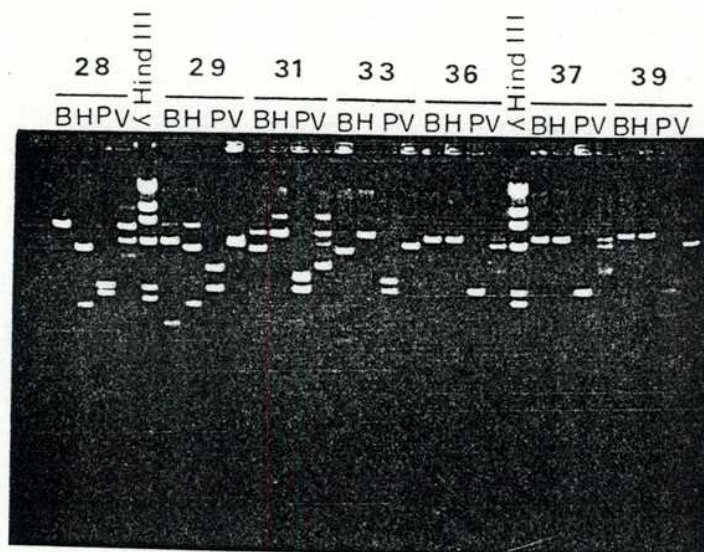
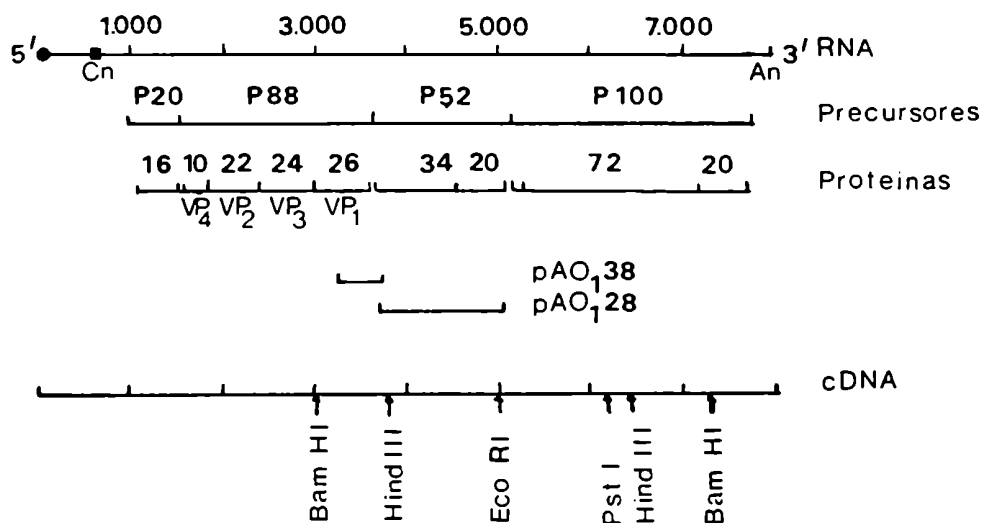


FIGURA 11. Mapas de restricción del cDNA de la cepa O₁K y del plásmido pAO₁28.

(a): Mapa de restricción del cDNA de la cepa O₁K extraído de Kurz et al. (162), en donde se muestran los sitios de restricción para las enzimas Bam HI, Hind III, Eco RI y Pst I.

(b): Mapa de restricción del plásmido pAO₁28, que contiene un inserto de cDNA de la cepa O₁ Campos. Se muestran los mismos sitios de restricción que en (a).

a)



b)

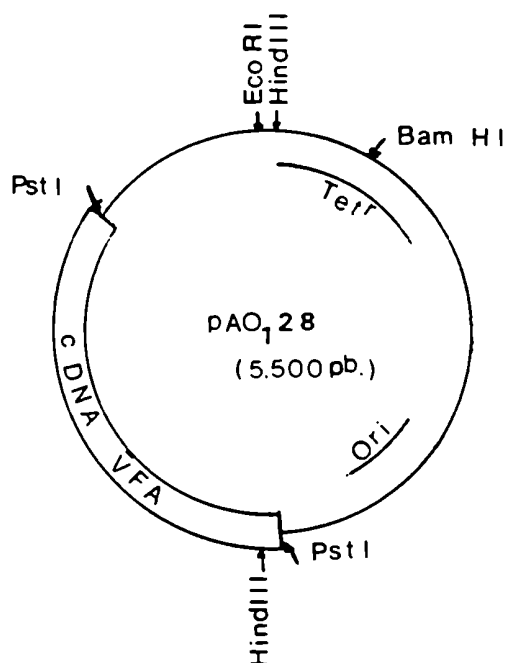
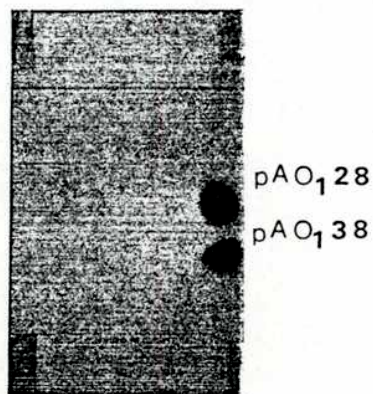


FIGURA 12. Obtención de una sonda de cDNA para la región genómica correspondiente a la proteína VP1.

(a): Autorradiografía de la hibridación en colonias mediante la cual se obtuvo el clon con secuencias correspondientes a la región genómica de VP1 (clon 38).

(b): Mapa de restricción del plásmido pAO₁₃₈. Se muestran los sitios de restricción para las mismas enzimas¹ que en la fig. 11.

a)



b)

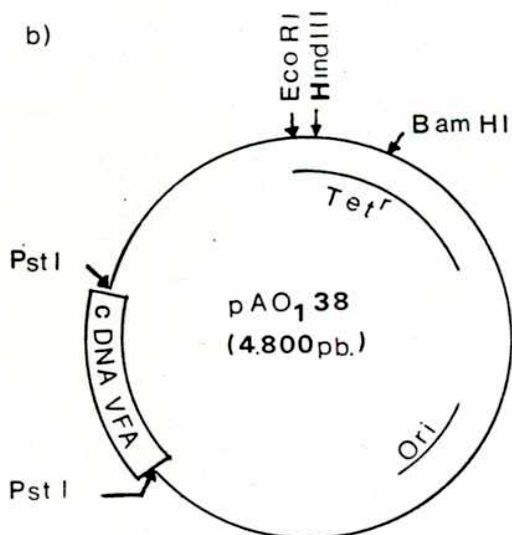
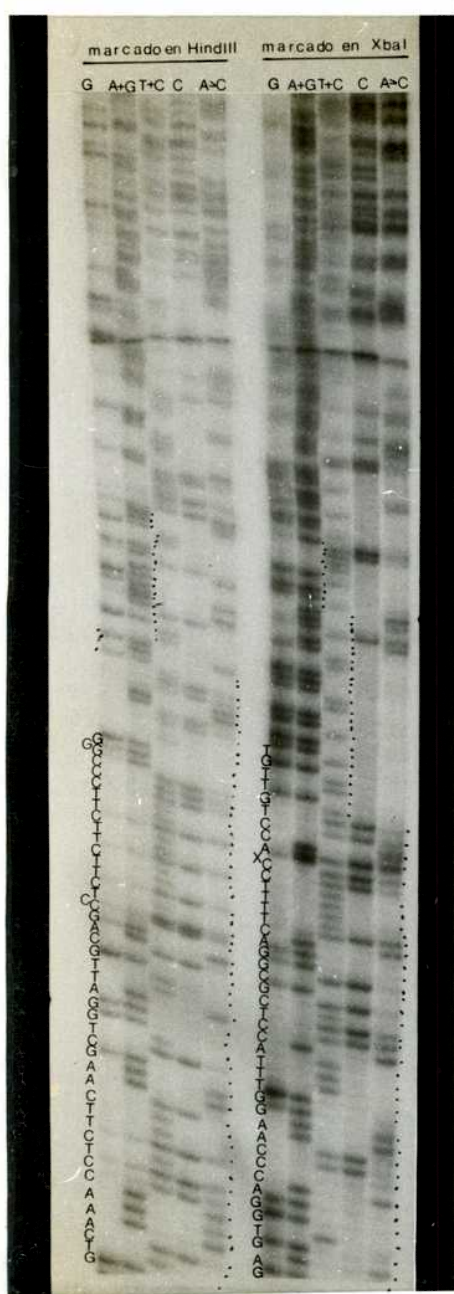


FIGURA 13. Secuencia nucleotídica de la sonda para VP1 derivada del plásmido PAO₁38.

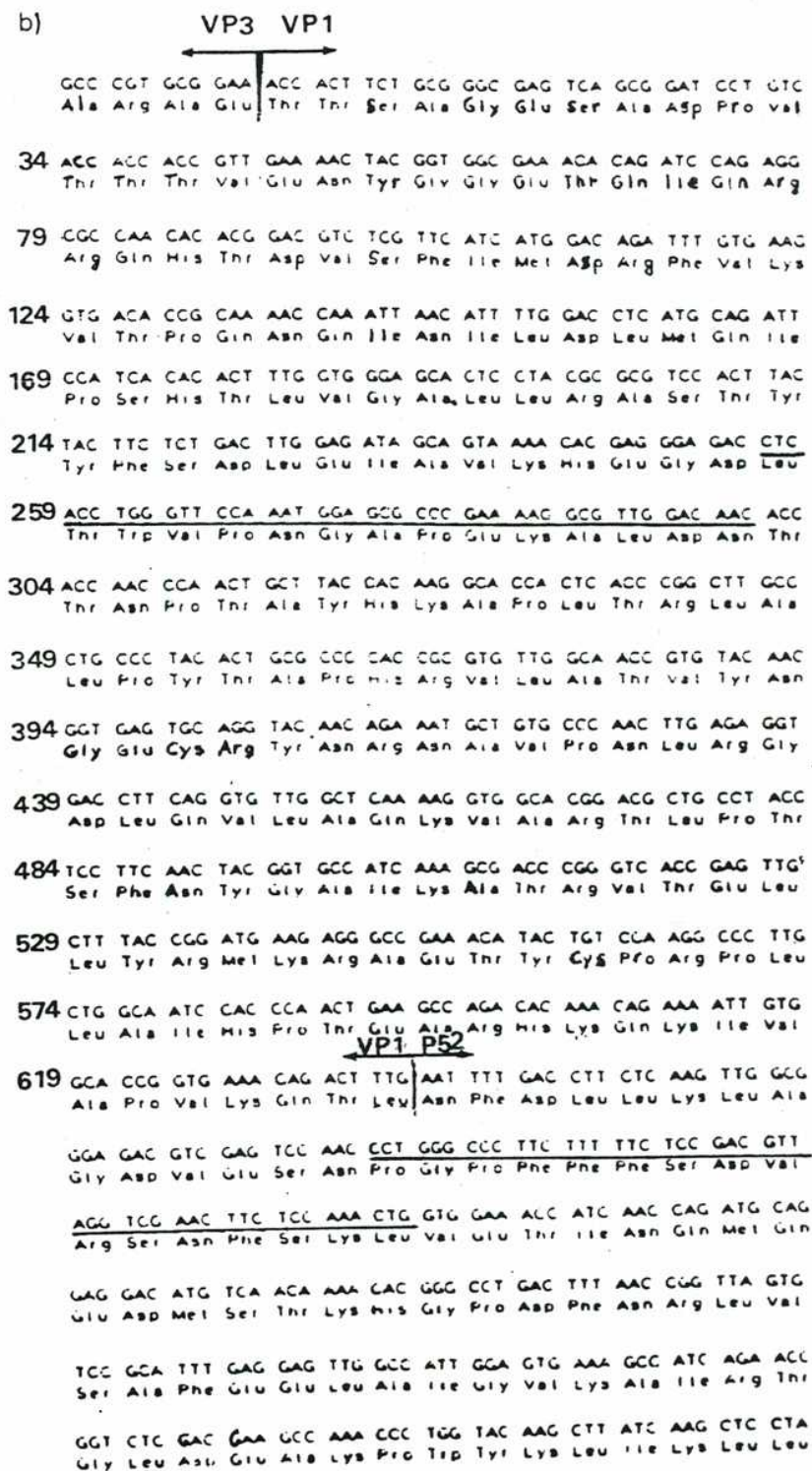
(a): Autorradiografía del gel de secuenciación de los extremos del inserto de cDNA del plásmido PAO₁38.

(b): Comparación de la secuencia obtenida para O₁K por Kurz et al. (162) con la obtenida en (a). Las secuencias subrayadas corresponden a las leídas en el panel (a).

a)



b)



2.12) los plásmidos que contenían un sitio para Hind III en el inserto. Los clones 28 y 29 fueron secuenciados marcando radiactivamente el sitio de Hind III del inserto, estableciéndose que el cDNA del clon 29 correspondía a P72 y el del clon 28 correspondía a P34. Este último plásmido fue denominado pAO₁28, cuyo mapa se encuentra en la figura 11. Al secuenciar los extremos del cDNA de este plásmido se comprobó que no se extendía dentro de la región genómica correspondiente a VP1.

Con el objeto de encontrar un sonda mejor que pAO₁28, que contuviera secuencias de P52 y VP1, se decidió utilizar al inserto de pAO₁28 como sonda para testear otros clones. Para ello se utilizó el método de hibridación en colonias (ver 2.13). Como sonda se utilizó el inserto aislado de pAO₁28 previa digestión con la enzima Pst I. En la figura 12 se observa la autorradiografía tomada de la hibridización en colonias antedicha, en la cual sólo una colonia, a parte de pAO₁28, hibridó con la sonda. Este nuevo clon denominado pAO₁38, fue secuenciado y se determinó que el cDNA se extiende desde el aminoácido 137 de VP1 (en su extremo 5') hasta P52 (Figura 13). El inserto tiene una longitud de aproximadamente 600 pares de bases según puede apreciarse en el mapa del plásmido pAO₁38 en la figura 12.

El inserto del plásmido pAO₁38 fue utilizado como sonda para obtener clones bacterianos con cDNA de VP1 del C3 clon.

3.3.2 Clonado molecular de la cepa C₃ Resende.

Una vez obtenida la sonda para detectar clones de cDNA con secuencias de VP1 (ver 3.3.1), se procedió a clonar el genoma del C3 clon. Para ello se produjo virus en células BHK-21, se extrajo el RNA genómico y se lo utilizó como templado para la síntesis de cDNA. Tanto la primera cadena como la segunda cadena de cDNA fueron enteramente similares a las producidas durante el clonado de la cepa O₁ Campos (figura 8). En la titulación de S1 se determinó que debía utilizarse la misma concentración

de nucleasa que la empleada en el cDNA de doble cadena de la cepa O₁ Campos (figura 9), es decir la dilución 10⁻³ de S1.

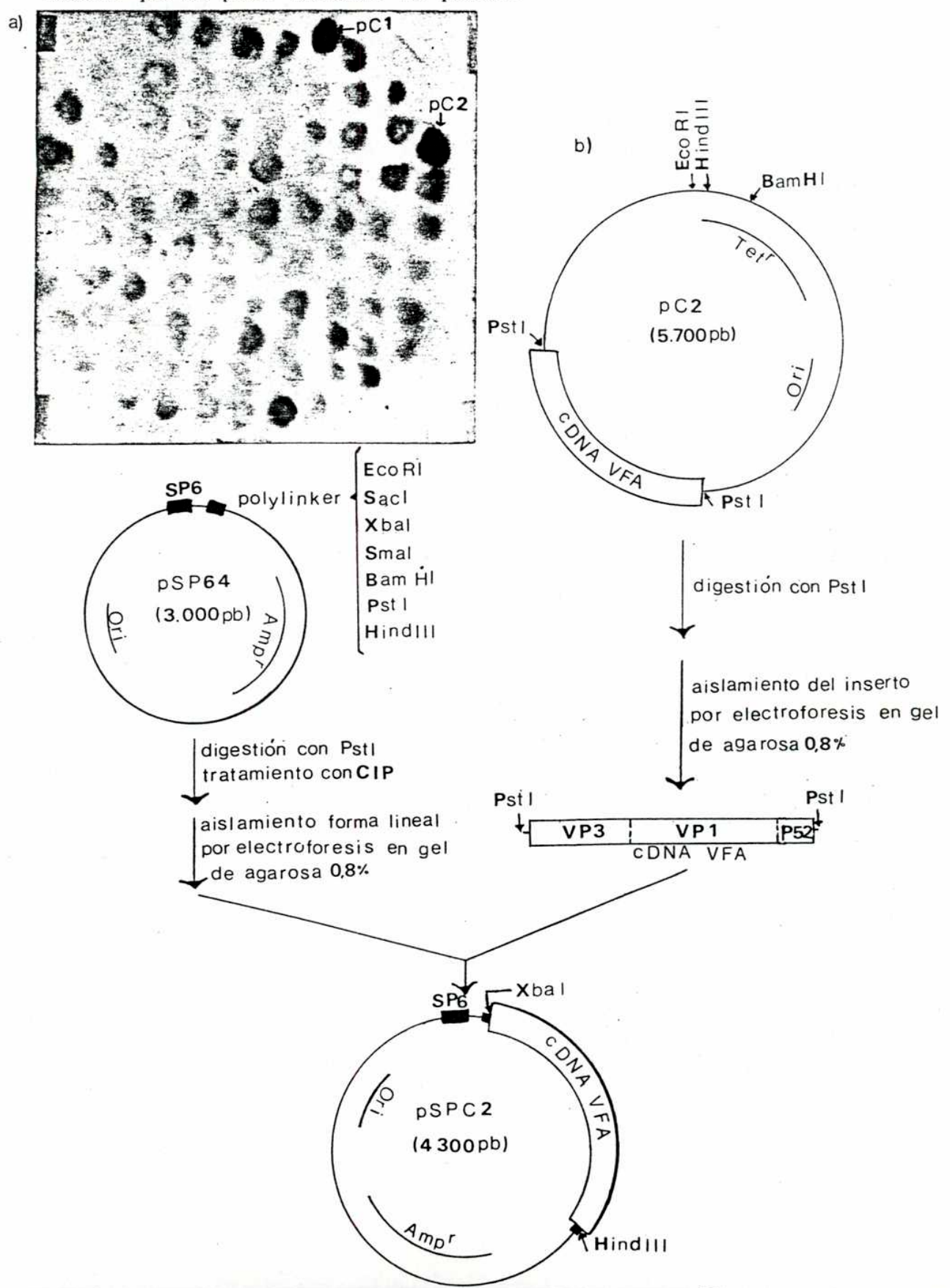
Luego del agregado de homopolímeros pegajosos al cDNA, se lo anilló con el plásmido pBR322 y se transformaron células DH1 (ver 2.9.4 a 2.9.6). Se obtuvieron alrededor de 200 colonias Amp^S-Tet^R, las cuales fueron hibridados "in situ" (ver 2.13) con el inserto del plásmido pAO₁38 (digerido con la enzima Pst I) aislado por electorforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, y marcado radiactivamente por el método de "nick translation". En la figura 14 puede apreciarse la autorradiografía de la hibridación en colonias mediante la cual se detectaron dos clones positivos, es decir que contenían secuencias de cDNA que probablemente correspondían a VP1 del C3 clon. Se realizaron minipreparados de ambos clones positivos y se los restringió con Pst I. Uno de los clones que presentó el inserto de cDNA más grande (1.300 pb.) fue denominado pC2 y purificado (ver 2.11) con el objeto de secuenciar el cDNA.

3.4 SECUENCIACIÓN DEL cDNA DEL C3 CLON CORRESPONDIENTE A LA REGIÓN ADYACENTE A VP1.

Con el objeto de secuenciar el cDNA de la región adyacente a VP1, es decir la correspondiente a P52, se reclonó el inserto de pC2 en el polylinker del plásmido pSP64. Se restringió a pC2 con la enzima Pst I y se purificó el inserto mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión. Este cDNA fue ligado al plásmido pSP64 previamente linealizado con la enzima Pst I y tratado con fosfatasa alcalina (ver 2.15). Luego de transformar células DH1 y seleccionar colonias Amp^R se realizaron 12 minipreparados, los cuales fueron restringidos con Pst I. Uno de ellos, que contenía el inserto de cDNA de 1.300 pb., se lo denominó pSPC2, y se lo purificó con el objeto de secuenciarlo. Para ello se digirió a pSPC2 con la enzima Hind III, se marcó radiactivamente ese extremo rellenándolo

FIGURA 14. Detección del clon pC2 y reclonado del inserto para obtener pSPC2.

(a): Autorradiografía de la hibridación en colonias de los clones que contienen el cDNA del C3 clon. Como sonda se utilizó el inserto del pAO₃₈. (b): Esquema de reclonado del inserto de pC2 en el vector pSP64 para obtener el pSPC2.



con DNA polimerasa fragmento Klenow, en presencia de dATP alfa-³²P (ver 2.12) para luego digerirlo con la enzima Xba I y así obtener el inserto de cDNA marcado en un solo extremo. En la figura 14 se observa un esquema del reclonado y marcado de pSPC2. El inserto fue purificado a través de un gel de agarosa y secuenciado (ver 2.12). En la figura 15 se observa la autorradiografía del gel de secuenciación y se comparan las secuencias obtenidas con las de los subtipos C1, O1 y A10 (165). De esta forma pudo establecerse la existencia de una zona muy conservada ideal para utilizarla como sitio de iniciación en la síntesis de cDNA.

3.5 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE DE VP1 DEL C3 CLON.

Una vez determinado que la región genómica constante para la mayor parte de los serotipos del VFA también se encontraba presente en el C3 clon, se sintetizó un oligonucleótido complementario a esa región para utilizarlo como iniciador en el sistema rápido de secuenciación (ver 2.14). Se obtuvo el oligonucleótido complementario a la región determinada en la figura 15 como constante, cuya secuencia fue 5'-GGGCCAGGGTTGGACTC-3. Este oligonucleótido denominado PR1 fue utilizado para primar la síntesis de cDNA utilizando como templado al RNA purificado del C3 clon. Así se obtuvo la secuencia nucleotídica de la región hipervariable de VP1. Como puede observarse en la figura 16 solo fue posible determinar la secuencia de alrededor de 200 pares de bases utilizando geles en gradientes, es por ello que se optó por sintetizar un nuevo oligonucleótido para ser utilizado como iniciador de la síntesis de cDNA dentro de VP1, y así poder conocer la secuencia entre los aminoácidos 130 y 170 (región hipervariable). Para ello se compararon las secuencias del subtipo C₁ con las de la cepa

FIGURA 15. Secuencias de la región adyacente al extremo 3' de VP1 de la cepa C3 Resende.

(a): Autorradiografía del gel de secuenciación del inserto de pSPC2 marcado radiactivamente en el sitio de restricción para Hind III.
 (b): Comparación de las secuencias adyacentes al extremo 3' de VP1 de los subtipos C1, O1 y A10, obtenidos de Beck et al. (165) con las obtenidas en (a) para el C3 clon de la cepa C3 Resende.

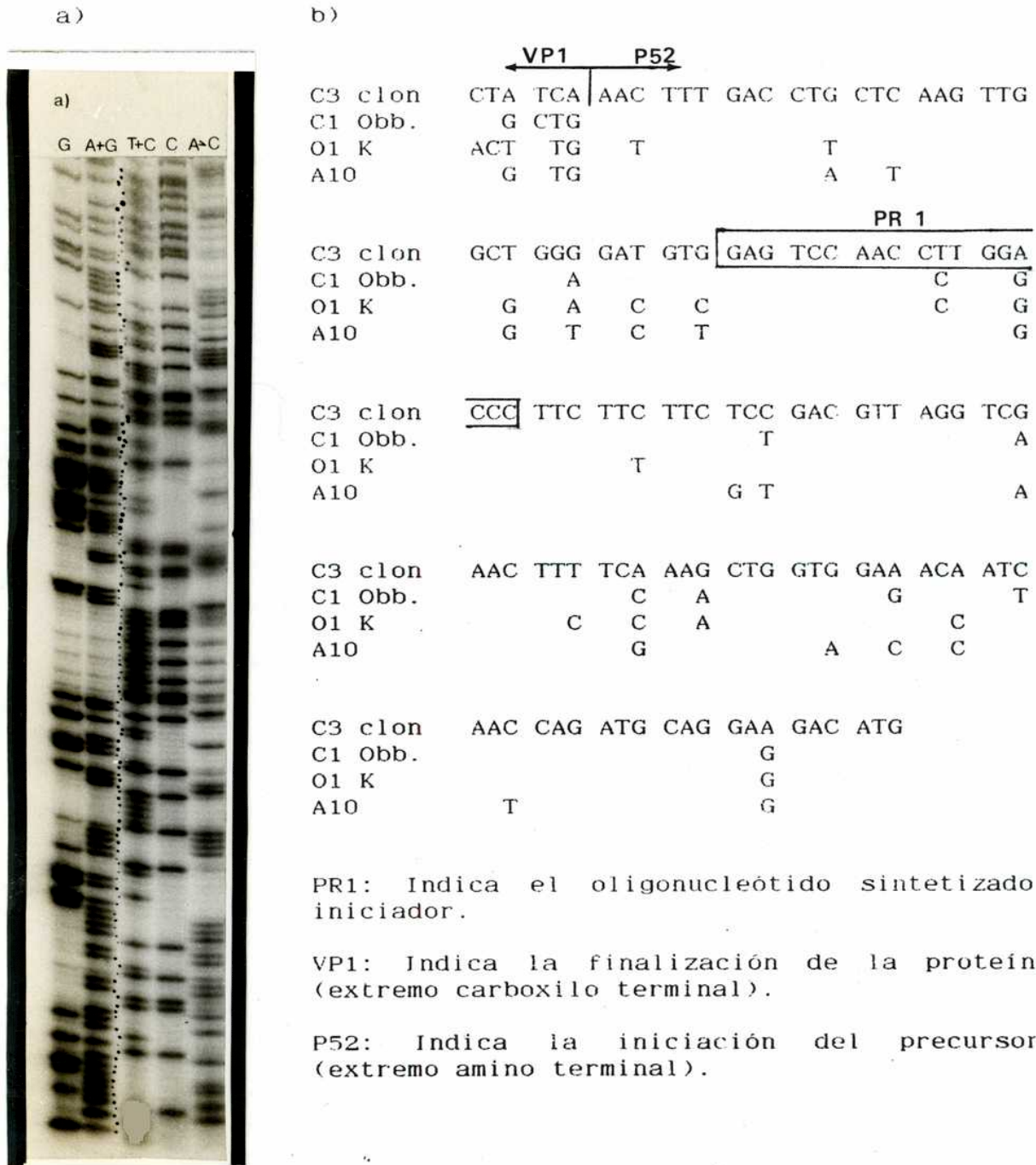


FIGURA 16. Secuencia del cDNA de la región carboxilo terminal de VP1, obtenida a partir del primado con PR1.

Se utilizó como iniciador de la síntesis de cDNA al oligonucleótido PR1 (ver figura 15 y punto 3.5). La secuencia correspondiente al oligonucleótido PR2 fue determinada en este gel. El análisis de la secuencia de esta autorradiografía se encuentra en la figura 17. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida 6% mediante el sistema de gradiente de buffer.

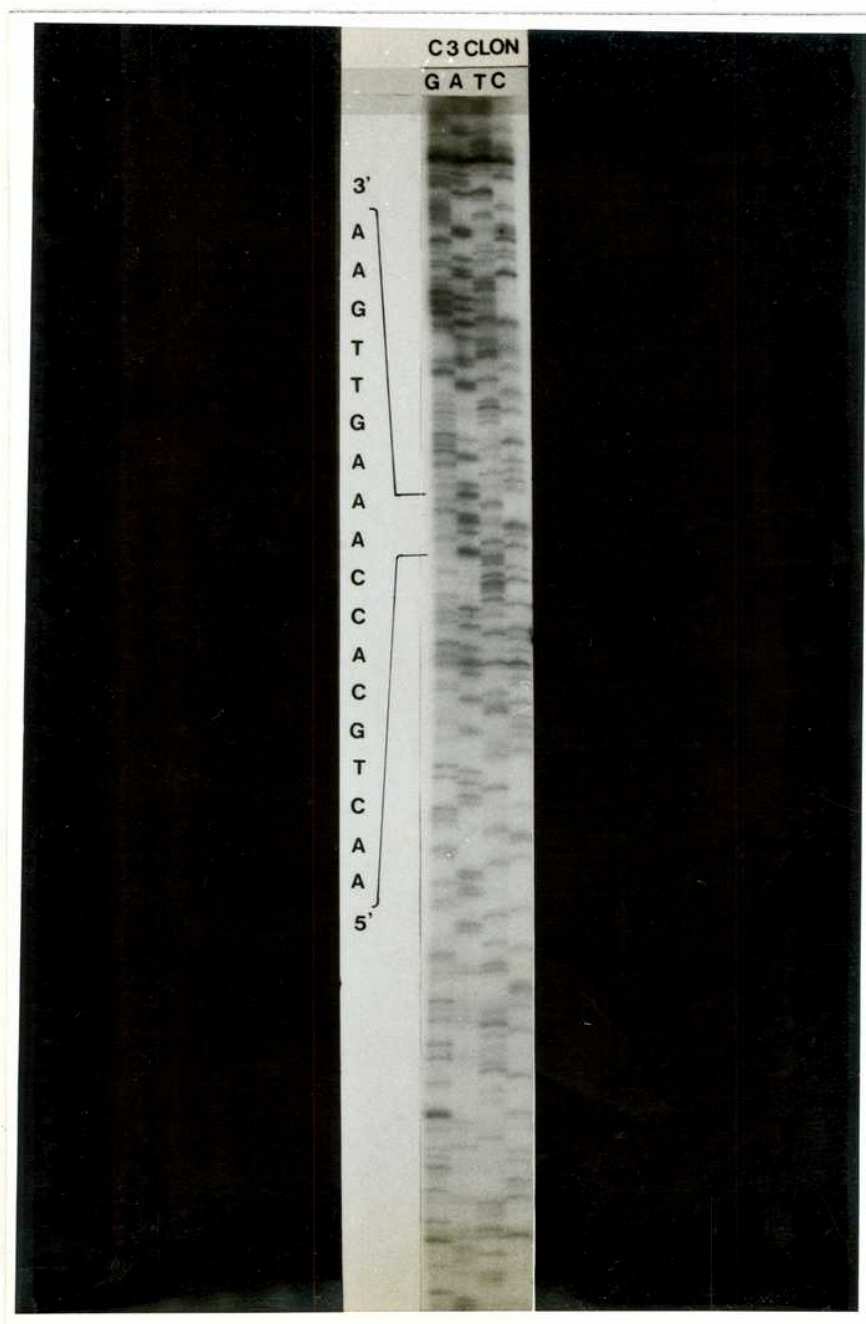


FIGURA 17. Comparación de secuencias nucleotídicas de diferentes cepas del serotipo C del VFA, con la obtenida del C3 clon.

Se comparan las secuencias de cDNA de las cepas C₁ Obberbavern (C1 Obb.), C₃ Indaial obtenida por el grupo de Biogen (C3 I B) y C₃ Indaial obtenida por el grupo de Pirbright (C3 I P) publicadas por Cheung et al (242), con la obtenida en este trabajo para el C₃ Resende (C3 clon). Se encuentran indicados los cambios que se producen en las otras cepas respecto de C3 clon. Las deleciones de nucleótidos se indican con guiones. La numeración comienza en la base 1 de VP1 (extremo aminoterminal) y finaliza en la base 630 (extremo carboxiloterminal).

345
 C3 clon CTG GCT CTC CCA TAC ACC GCG CCA CAC CGC GTG TIG
 C3 I P A
 C3 I B A C
 C1 Obb. T

381
 C3 clon GCC ACG ACG TAC ACT GGT ACA ACA ACC TAC ACT ACC
 C3 I P C G G G
 C3 I B G C G G
 C1 Obb. T G C T G C G

417
 C3 clon AGT GCA CGT AGA GGA GAT CTG GCC CAT TTG GCG ACA
 C3 I P G A C C G G G
 C3 I B G T C G C A C G G
 C1 Obb. A C - G -- T T C C A A G G

453
 C3 clon GCA CAC GCT CGG CAC TTG CCG ACG TCG TTC AAC TIT
 C3 I P G C A T
 C3 I B G C A T
 C1 Obb. A G GT C G T A A T

489
 C3 clon GGT GCA GTT AAA GCA GAA ACA GTC ACT GAG CTG CTG
 C3 I P G A A T
 C3 I B G A A T
 C1 Obb. G A T C

525
 C3 clon GTG CGC ATG AAG CGT GCA GAA CTC TAT TGC CCC AGG
 C3 I P A T C A
 C3 I B T C A
 C1 Obb. T T I

561
 C3 clon CCG ATT CTT CCG ATT CAA CCA ACG GGC GAC AGA CAC
 C3 I P G C G C
 C3 I B G C G C G T G
 C1 Obb. G T G

597 630
 C3 clon AAG CAA CCG CTC ATC GCG CCG GCG AAA CAG CTA TCA
 C3 I P T A G CTG
 C3 I B A T A G CTG
 C1 Obb. G A T A G CTG

C_3 Indaial (242) y las obtenidas para el C3 clon. En la figura 16 se observa la autorradiografía del gel de secuenciación de la región carboxiloterminial de VP1 que muestra el oligonucleótido elegido por ser constante entre los distintos subtipos. En la figura 17 se comparan las secuencias de las cepas C_1 Obb y C_3 Indaial (obtenidas en Pirbright y en Biogen) publicadas por Cheung et al. (242) con la obtenida del C3 clon. Cabría esperar que este oligonucleótido que se conservó constante no varíe en las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares. Es por ello que se obtuvo el oligonucleótido 5'-AACTGCACCAAAGTTGAA-3' y se lo denominó PR2.

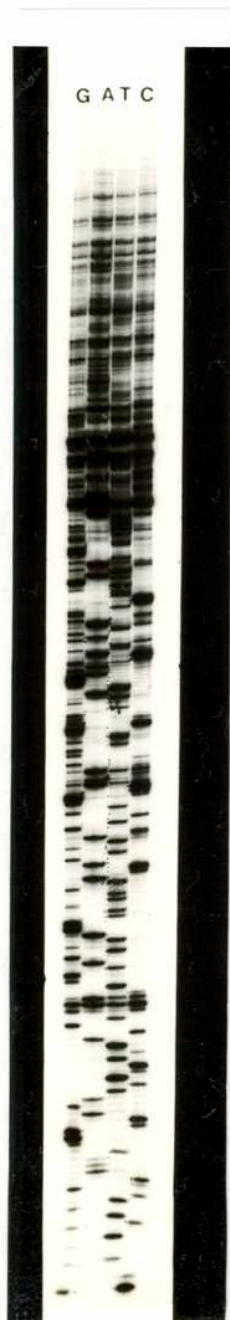
En la Figura 18 se observa la autorradiografía del gel de secuenciación en el cual el cDNA del C3 clon fue primado con el oligonucleótido PR2. Se compararon las secuencias obtenidas con las publicadas para C_1 y para C_3 Indaial (ver figura 17). Entre el C3 clon y la cepa C_3 Indaial secuenciada en Pirbright se encontraron 33 cambios, la mayoría de los cuales (23 de ellos) se produjeron en la tercer base de cada codón y por lo tanto no representan cambios en aminoácidos. Se observó un mayor número de cambios entre el C3 clon y el C_3 Indaial secuenciado por Biogen (40 cambios) de los cuales 27 son en la tercera base de cada codón. El mayor número de cambios se produjo entre el C3 clon y el C_1 Obb (47 cambios de los cuales 31 son en la tercer base). De las secuencias de VP1 del subtipo C3 analizadas en este trabajo, la más semejante a la cepa C_1 Obb. es la del C3 clon. Cheung et al. (242) detectaron una región complementaria dentro de la región variable de C_3 Indaial (Biogen) compuesta por 13 bases que presentan una simetría bilateral perfecta. Estas secuencias se encuentran entre las bases 385-397 (GCGTACACCGGTA) y las bases 411-423 (TACCGGTGTACGC). Probablemente se produce una estructura de tipo vástago y bucle en el RNA viral, involucrando 13 bases en el vástago y 13 en el bucle. Esta no se observa en la cepa

FIGURA 18. Secuencia de la región carboxilo terminal de VP1 obtenida por primado con PR2.

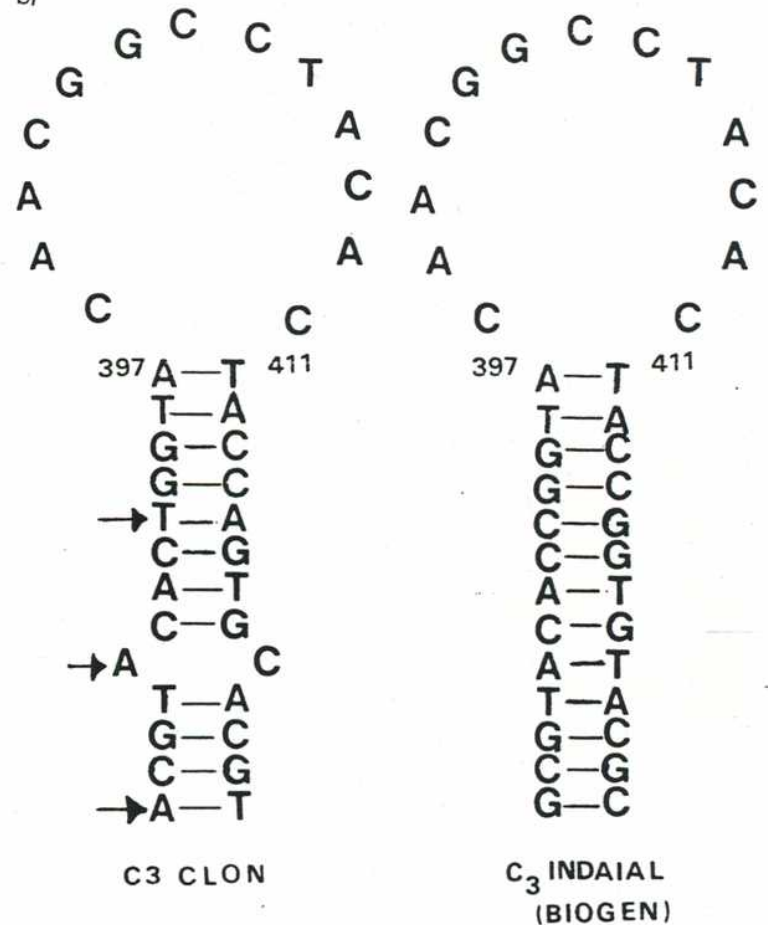
(a): Se utilizó como iniciador de la síntesis de cDNA al oligonucleótido PR2 (ver figura 16 y punto 3.5). El análisis de la secuencia de esta autorradiografía se encuentra en la figura 17. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida 6% mediante el sistema de gradiente de buffer.

(b): Estructura secundaria de tipo vástago-bucle que probablemente se forma en el RNA de la región carboxilo terminal de VP1 de las cepas C3 clon y C₃ Indaial (Biogen). Las flechas indican los cambios ocurridos en el C3 clon. La numeración corresponde a los nucleótidos en que comienza y finaliza el bucle (ver fig. 17).

a)



b)



C₃ Indaial secuenciada en Pirbright, pero sí en el C3 clon, en donde se producen 6 cambios en el vástago, 4 de los cuales se aparean permitiendo la formación de la estructura vástago-bucle (ver figura 18).

Una de las particularidades del C3 clon es que el sitio de clivaje entre VP1 y P52 está determinado por los aminoácidos serina y asparragina, en vez de leucina y asparragina encontrados en las otras cepas hasta ahora analizadas. Esto fue corroborado secuenciando ambas cadenas de cDNA por el método degradativo. En la figura 19 pueden observarse los cambios en la composición de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos del C3 clon, C₃ Indaial de Biogen, C₃ Indaial de Pirbright, y C₁ Obb. En los aminoácidos 139, 140 y 198, el C₃ Indaial obtenido en Pirbright tiene los mismos cambios que el C3 clon; esto llevaría a pensar que estas dos cepas están más relacionados entre sí, encontrándose solo 7 aminoácidos diferentes. En cambio entre el C3 clon y el C₃ Indaial secuenciado por Biogen existen 10 cambios, algunos de los cuales son comunes con los producidos en el C₃ Indaial de Pirbright. Entre el C₁ y el C3 clon existen 11 cambios, 8 de los cuales se encuentran entre los aminoácidos 138 a 157, estos cambios son probablemente los involucrados en las diferencias antigénicas entre el subtipo C₁ y el C₃ pues se encuentran localizados en el sitio antigénico inmunodominante (242). Los aminoácidos 134, 191 y 194 son iguales en el C₁ Obb. y el C3 clon y diferentes de lo encontrados en el C₃ Indaial.

3.6 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CARBOXILOTERMINAL DE VP1 DE LAS POBLACIONES VIRALES OBTENIDAS DURANTE LOS PASAJES SERIADOS POR LOS DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.

Para determinar la secuencia nucleotídica de la región hipervariable de la proteína VP1 de las distintas poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por los sistemas celulares empleados en este trabajo, se optó por utilizar el sistema de secuenciación rápida de cDNA usando los iniciadores

FIGURA 19. Comparación de secuencias de aminoácidos de distintas cepas del serotipo C con la del C3 clon.

Se comparan las secuencias de aminoácidos de la región carboxilo terminal de VP1, deducidas de las secuencias nucleotídicas de la figura 17. Se encuentran indicados los cambios que se producen en las otras cepas con respecto a la secuencia del C3 clon. Las deleciones de aminoácidos se indican con guiones. La numeración de los aminoácidos corresponde a la utilizada por Cheung et al.(242), y comienza con 1 en el extremo aminoterminal para finalizar con 213 en el extremo carboxiloterminal de VP1.

120

C3 clon LEU ALA LEU PRO TYR THR ALA PRO HIS ARG VAL LEU ALA THR
 C3 I B
 C3 I P
 C1 Obb.

130140

C3 clon THR TYR THR GLY THR THR THR TYR THR THR SER ALA ___ ___
 C3 I B ALA ALA GLY VAL ___ ___
 C3 I P ALA ALA ___ ___
 C1 Obb. GLY ALA THR ___ ___

150

C3 clon ___ ARG ARG GLY ASP LEU ALA HIS LEU ALA THR ALA HIS ALA
 C3 I B ___ ALA
 C3 I P ___ ALA
 C1 Obb. ___ THR ALA THR ARG

160170

C3 clon ARG HIS LEU PRO THR SER PHE ASN PHE GLY ALA VAL LYS ALA
 C3 I B
 C3 I P
 C1 Obb. GLY

180

C3 clon GLU THR VAL THR GLU LEU LEU VAL ARG MET LYS ARG ALA GLU
 C3 I B ILE
 C3 I P ILE
 C1 Obb. ILE

190

C3 clon LEU TYR CYS PRO ARG PRO ILE LEU PRO ILE GLN PRO TYR GLY
 C3 I B VAL VAL ALA
 C3 I P VAL VAL
 C1 Obb.

200210

C3 clon ASP ARG HIS LYS GLN PRO LEU ILE ALA PRO ALA LYS GLN LEU
 C3 I B
 C3 I P
 C1 Obb.

← VP1 P52 →

C3 clon SER ASN
 C3 I B LEU
 C3 I P LEU
 C1 Obb. LEU

PR1 y PR2 descritos en el punto 3.5. En la figura 20 se observa la estrategia seguida para la obtención de las secuencias nucleotídicas.

El RNA de las poblaciones virales de los pasajes 5 y 15 por células BHK-21, IBRS-2, RFB y TFB fueron purificados y utilizados para secuenciar el extremo carboxilo terminal de la proteína VP1 (ver 2.14 y figura 20).

En las figuras 21, 22 y 23 pueden observarse las autorradiografías de los geles de secuenciación de los distintos RNA genómicos sometidos a electroforesis en geles en gradiente (ver 2.14). En la figura 24 se observa las secuencias de los pasajes IBRS 15, BHK 15, RFB 15 y TFB 15 cuya síntesis de cDNA fue iniciada con el primador PR2 y sometido a electroforesis en un gel lineal de acrilamida 8%, con el objeto de corroborar fehacientemente la secuencia de la región hipervariable entre los aminoácidos 130 y 170. Los pasajes 5 por todos los sistemas celulares utilizados en el presente trabajo fueron analizados en forma similar (no se muestra la autorradiografía). Un análisis cuidadoso de las secuencias de todos estos geles demostró que no existen diferencias en la región carboxiloterminale de VP1 de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares. Por lo tanto los cambios en el comportamiento de las poblaciones analizadas no se deben a cambios en la región hipervariable carboxiloterminale de VP1. La evolución de las poblaciones virales mediada por la célula huésped, en esta cepa C₃ Resende, no favorecería cambios en la región hipervariable, como lo reportados para el tipo A (74).

FIGURA 20. Esquema de la estrategia utilizada para obtener las secuencias nucleotídicas del extremo carboxilo terminal de la proteína VP1, de poblaciones virales producidas durante los pasajes seriados por los diferentes sistemas celulares.

El RNA de viriones es utilizado como plantilla para la síntesis de cDNA. Se utilizan dos iniciadores diferentes, PR1 en el extremo 3' de VP1 y PR2 dentro de VP1. El cDNA es sintetizado en presencia de un dideoxinucleótido que funciona como terminador de cadena (ddNTP). Al separarse las 4 reacciones en un gel (para cada una de las bases G, A, T, y C) se obtiene la secuencia deseada.

VPg indica la proteína covalentemente unida al extremo 5' del genoma; (A)_n indica el extremo 3' poliadenilado; C determina la localización del poli (C). La numeración corresponde al número de bases.

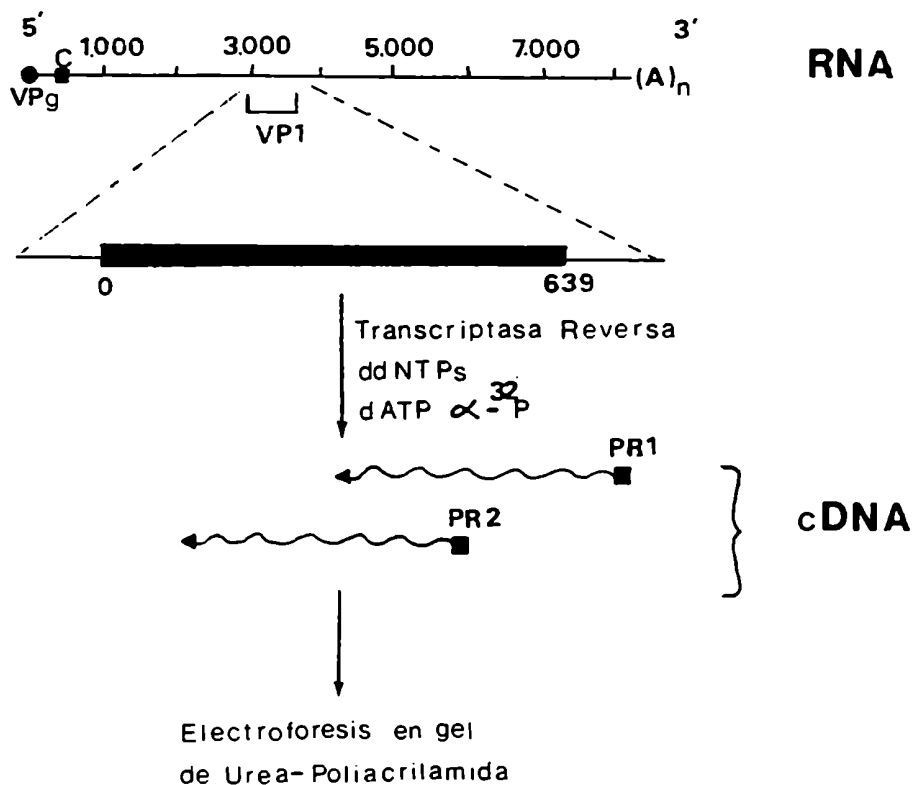


FIGURA 21. Secuencia nucleotídica del extremo 3' de VP1 de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes RFB 05, RFB 15 y TFB 15.

Autorradiografía de un gel 6% de poliacrilamida en gradiente de buffer. G, A, T, y C indican la presencia de ddGTP, ddATP, ddCTP y ddTTP respectivamente en cada una de las reacciones de síntesis de cDNA. PR1 o PR2 indican la utilización de uno u otro iniciador en la síntesis de cDNA.

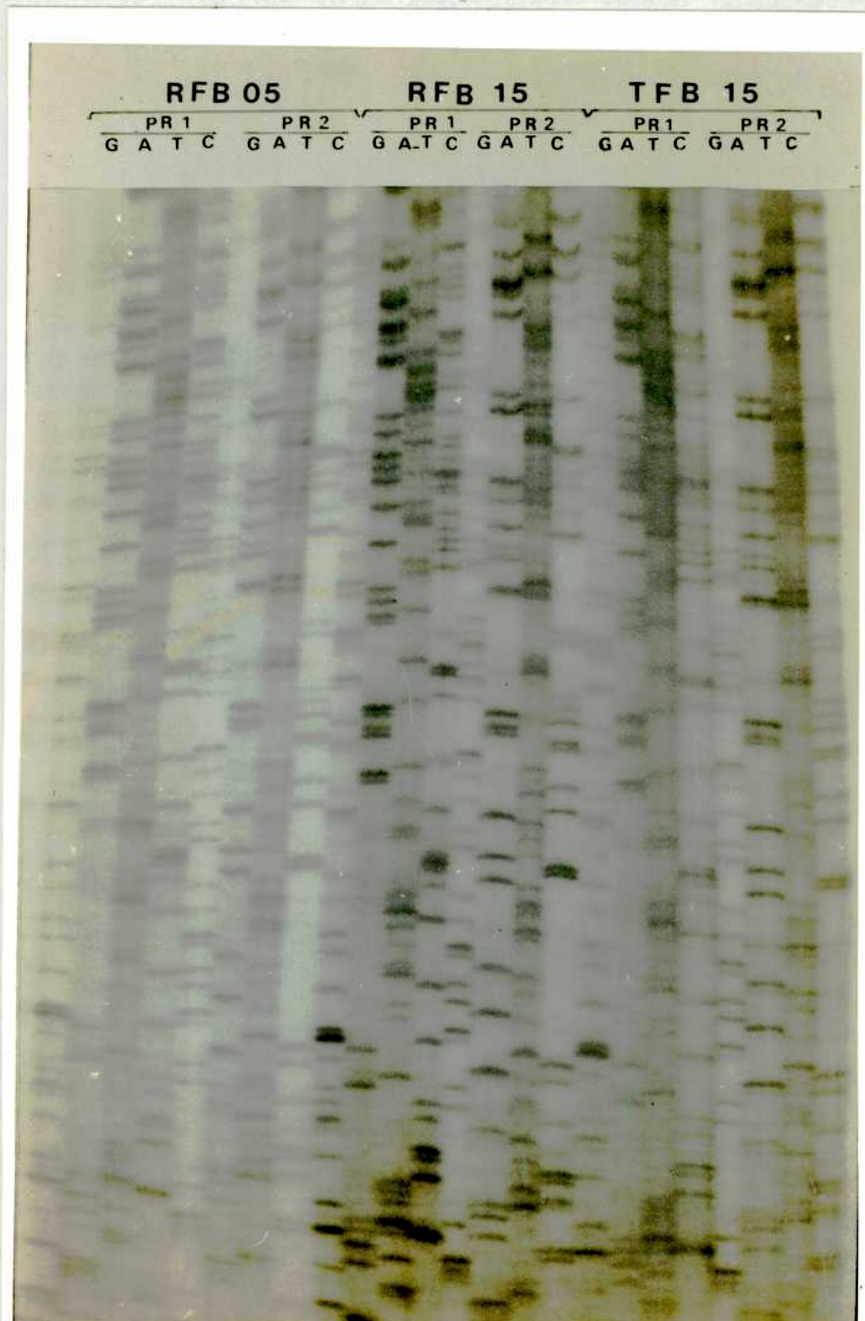


FIGURA 22. Secuencia nucleotídica del extremo 3' de VP1 de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes TFB 05, BHK 05 y BHK 15.

Autorradiografía de un gel 6% de poliacrilamida en gradiente de buffer. Se usaron las mismas abreviaciones que en la figura 21.

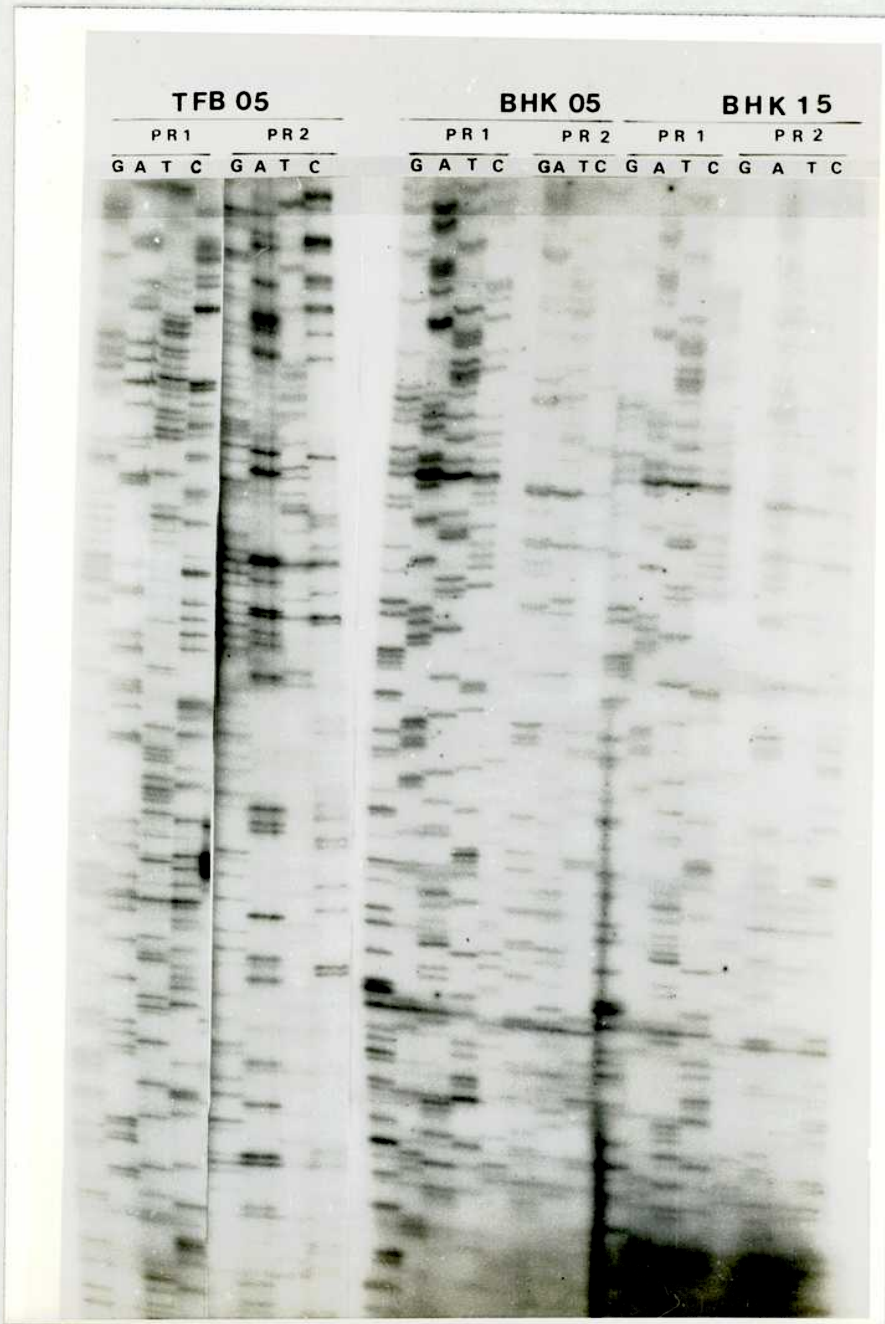


FIGURA 23. Secuencia nucleotídica del extremo 3' de VP1 de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes IBRS 05 e IBRS 15.

Autorradiografía de un gel 6% de poliacrilamida en gradiente de buffer. Se usaron las mismas abreviaciones que en la figura 21.

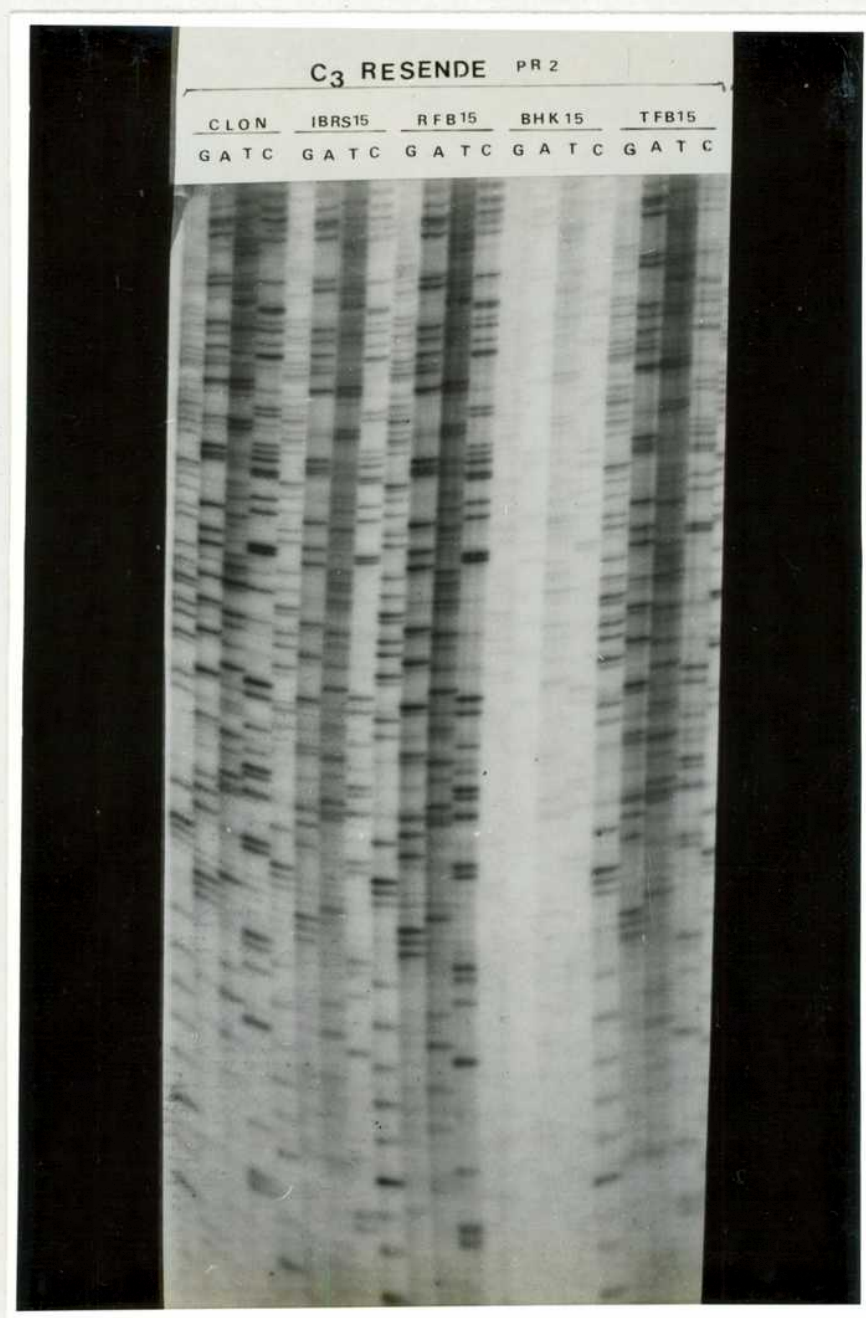
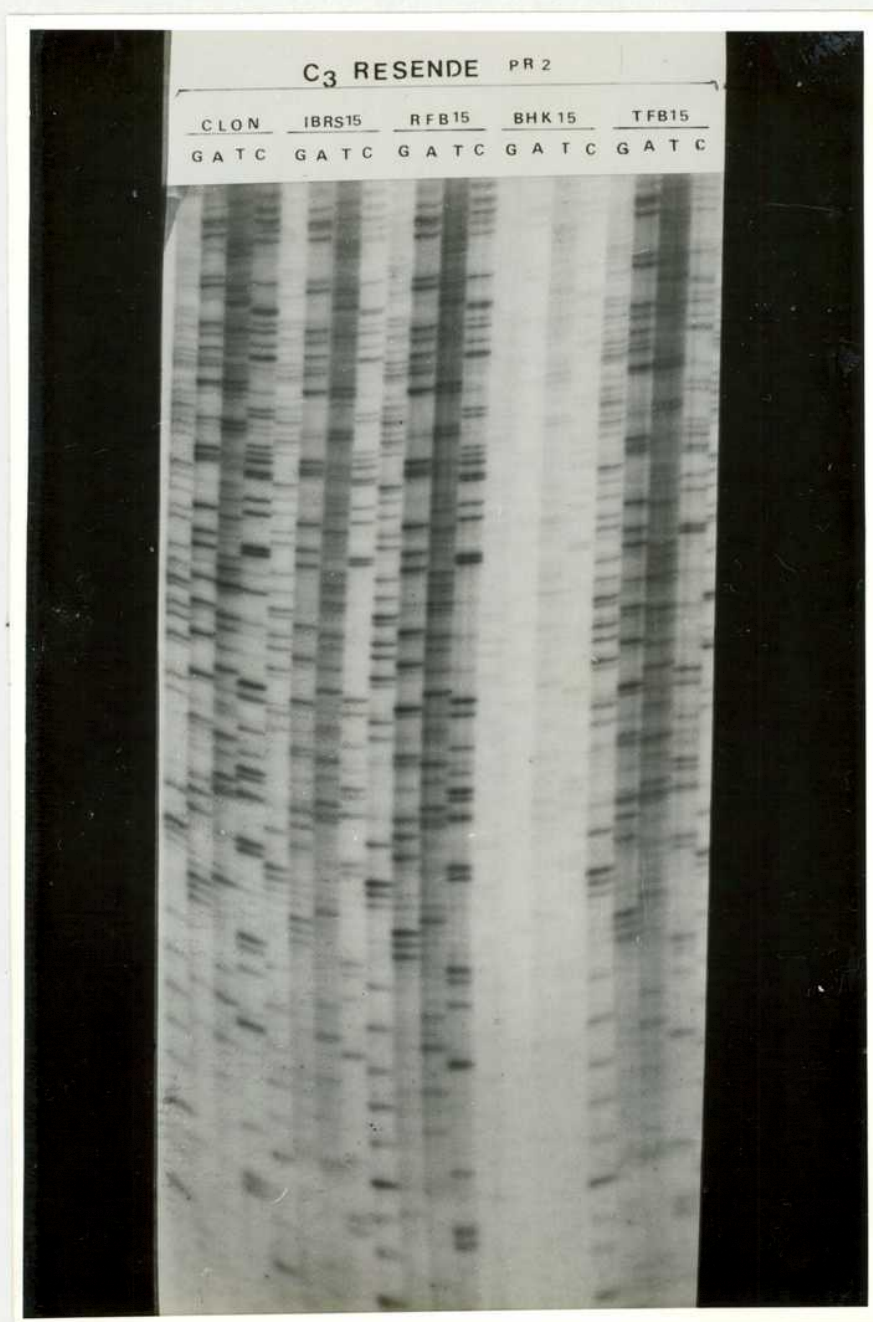


FIGURA 24. Corroboración de la secuencia nucleotídica de la región hipervariable de VP1 (aminoácidos 130 a 170) de los pasajes IBRS 15, RFB 15, BHK 15 y TFB 15.

Se utilizó el iniciador PR2 en la síntesis de cDNA. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida 8% lineal. Se usaron las mismas abreviaciones que en la figura 21.



4. DISCUSIÓN

4.1 EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES VIRALES DURANTE LOS PASAJES SERIADOS POR LOS DISTINTOS SISTEMAS CELULARES.

Se ha evidenciado el alto grado de variabilidad que presentan los genomas a RNA desde los primeros estudios con virus. Observaciones recientes sugieren que las poblaciones de genomas a RNA están compuestas por distribuciones complejas de variantes. Las poblaciones de la mayoría de los virus a RNA (estén o no clonadas) no consisten en una sola especie genómica, pues están compuestas por una mezcla heterogénea de genomas relacionados, constituyendo una cuasiespecie (40). Esto se produce principalmente por la alta tasa de mutación en la replicación del RNA, debido a la falta de un sistema de fidelidad de lectura (ver 1.1 a 1.6). Muchos de los cambios fenotípicos se deben a una o unas pocas alteraciones genómicas. Este es aparentemente el caso de variantes resistentes a la neutralización con anticuerpos monoclonales (265,266). Wunner et al. (267) secuenciaron variantes antigénicas del virus de la rabia, y observaron que utilizan un nuevo sitio de glicosilación, resultante de una mutación puntual que genera un cambio en un aminoácido de la glicoproteína. Variantes del virus de la encefalomiocarditis (EMC) que generan o no diabetes, difieren en uno o unos pocos oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1 (268). En otros sistemas virales la generación de variantes patogénicas o nopatogénicas pueden involucrar una o unas pocas mutaciones (269,270).

La generación y selección de variantes durante la replicación viral en cultivo de tejidos es un hecho ampliamente demostrado (ver 1.5). Un limitado número de pasajes en cultivo celular de un virus Coxsackie generó un nuevo tropismo celular, como resultado de la adquisición de un sitio para que los viriones se adsorban a un receptor (271). Pocos pasajes del VFA en cultivo de tejidos utilizando bajas m.o.i. (entre 0,01 y 0,04 UFP/célula), condujeron a la selección de variantes con una mayor producción de partículas durante las infecciones (50).

En el trabajo presentado en esta tesis, se realizaron pasajes seriados del C3 clon, una población del VFA obtenida por clonado mediante tres aislamientos en placa. Los pasajes seriados en distintos sistemas celulares (BHK-21, IBRS-2, RFB y TFB) utilizando m.o.i. entre 1 y 10 DICT_{50} por célula, condujeron a la aparición de variantes fenotípicas tomando en cuenta los siguientes parámetros: i) Tiempo de efecto citopático total, ii) Infectividad para células de RFB y BHK-21, iii) Patogenicidad para ratón lactante y iv) Masa de viriones producida durante la infección. En general la tendencia evolutiva de las poblaciones condujo hacia la selección de variantes que presentaron ciclos de vida más cortos que el del clon inicial, es decir, disminuyeron el tiempo necesario para producir efecto citopático total (ver 3.1). Esto probablemente se correlaciona con la tendencia a producir una masa viral menor con una mayor infectividad específica (ver 3.1.4). Así se seleccionaron aquellas poblaciones que produjeron un rápido efecto citopático, probablemente debido a la mayor citotoxicidad de los productos génicos cuya acumulación indujo una rápida lisis celular. Esta observación, distinta a la hecha por Sobrino et al. (50), es posible que se deba a las m.o.i. con que se realizaron los pasajes seriados. En el primer caso, con bajas m.o.i. se seleccionaron aquellas poblaciones que produjeron mayor número de partículas, mientras que en el segundo caso, con altas m.o.i. (en donde todas las células se infectan al mismo tiempo) se produjo un solo ciclo de multiplicación viral y se indujo la selección de aquellas poblaciones virales capaces de lisar más rápidamente a la célula huésped. Si bien las m.o.i. en otros sistemas virales parecerían determinar la variabilidad del virus (ver 1.5), el comportamiento del VFA parecería ser indiferente, generándose variantes en pocos pasajes seriados a ambas m.o.i..

Las variantes generadas durante los pasajes seriados por los sistemas celulares poseen fenotipos diferentes, de acuerdo al sistema celular utilizado. Durante los pasajes seriados por células IBRS-2 se produjo una población viral con una menor

infectividad para células BHK-21, en los pasajes por células de TFB se produjo (en el pasaje 10) una población atenuada para la patogenicidad en ratón lactante, mientras que en los pasajes por células BHK-21 la atenuación para la patogenicidad en ratón lactante apareció en el pasaje 15. En los pasajes por células de RFB no se produjeron modificaciones fenotípicas en cuanto a la infectividad y patogenicidad (ver 3.1.2 a 3.1.4), debido a que probablemente en este sistema celular (similar al huésped natural del virus) se ejercen presiones selectivas que tienden a mantener el fenotipo observado en el clon inicial.

Contrariamente a la alta variabilidad que se observa en algunos sistemas virales, en otros se encuentra un alto grado de estabilidad. El extremo 3' del RNA de doble cadena M1, de virus "killer" de diferentes cepas de levaduras, se mantiene constante (272) contrastando con la considerable heterogeneidad en las secuencias internas de distintos aislamientos (273). Además se ha observado un cierto grado de conservación en segmentos de RNA que codifican para algunas proteínas en virus a RNA animales o vegetales (274-278). Esto sugiere una fuerte selección para mantener algunas secuencias del genoma, y probablemente esto dependa del sistema virus-célula utilizado.

4.2 ¿TODOS LOS SEROTIPOS DEL VFA EVOLUCIONAN TAN RAPIDAMENTE?.

La mejor forma de evaluar esto es observar lo que sucede en el campo. La cepa O₁ Campos aislada en 1958, todavía protege a los animales vacunados con ella, luego de ser utilizado por más de un cuarto de siglo. Esto sugiere que el serotipo O es el más estable, debido probablemente a la mayor dificultad en la producción de anticuerpos neutralizantes contra el serotipo O que contra los serotipos A y C (279). Por lo tanto la presión selectiva sobre los determinantes antigénicos debe ser menor en O que en A y C.

Las secuencias de nucleótidos de distintas cepas del VFA (ver 1.8.9) permitió deducir la secuencia de aminoácidos,

estableciéndose que la variación entre las cepas del serotipo O era menor que la observada entre las cepas del serotipo C, y a su vez mucho menor que la observada para el serotipo A (242).

Otro de los hechos que sugieren una mayor variabilidad para el serotipo A es que la mayoría de los subtipos conocidos del VFA pertenecen a este serotipo (mas de 35).

En base a lo antes enunciado podría sugerirse que existe en el serotipo A algún mecanismo adicional que permite la alta variabilidad. Algunos investigadores han propuesto la existencia de una estructura secundaria en el RNA cercana a la región hipervariable de VP1 (74). Sin embargo para el serotipo C no se ha aclarado todavía si este mecanismo sería el causante de el grado intermedio de variabilidad; esto será discutido más adelante.

4.3 ¿POR QUÉ LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS NO SE MANIFESTARON EN LOS MAPAS BIDIMENSIONALES DE OLIGONUCLEÓTIDOS RESISTENTES A LA RNasa T1?.

Domingo et al. (43) trabajando sobre la variabilidad del VFA estimaron que solo un 7% de los nucleótidos genómicos podían ser analizados en los mapas bidimensionales. Por lo tanto la información obtenida mediante este método es muy restringida, pues si se asume que las mutaciones se distribuyen en todo el genoma, solo 1 de cada 14 se manifiestan en los mapas. Las mutaciones ocurridas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares, en este trabajo, evidentemente no se encuentran dentro de los oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1 analizables por mapas bidimensionales.

Sobrino et al. (50) al realizar pasajes seriados con bajas m.o.i. observaron cambios en los mapas de oligonucleótidos. En estas condiciones, el número de duplicaciones es por lo menos 100 veces mayor que al utilizar altas m.o.i. basandose en la estimación (hecha por los autortes antes citados) de que se producen alrededor de 50 a 100 particulas infectivas por célula.

En condiciones de bajas m.o.i las pocas células infectadas al inocular el virus, son las que producen partículas infectivas para el resto de las células de la monocapa. Al utilizar altas m.o.i. se infectan todas las células al mismo tiempo, produciendo un solo ciclo de replicación. Por lo tanto al utilizar bajas m.o.i. en los pasajes seriados se producen muchas más mutaciones, ya que ellas se generan durante la replicación genómica. Otros aspectos deben ser tomados en cuenta al comparar infecciones con altas o bajas m.o.i. como ser: i) la segregación de las poblaciones al diluir el stock viral con que se infecta a bajas m.o.i, enriqueciendo aquellas variantes que producen mayor número de partículas, ii) el efecto de las partículas DI y iii) la complementación de genomas que infectan a una misma célula al mismo tiempo (ver 1.5). Es por todo ello que al variar las m.o.i se producen importantes cambios en los sistemas y en las presiones de selección. Estas pueden ser algunas de las razones por las cuales no se observaron cambios en los mapas bidimensionales de oligonucleótidos, mientras que en los realizados por Sobrino et al., sí se observaron.

Durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares se produjeron cambios fenotípicos en las poblaciones virales, cuyos mapas bidimensionales de oligonucleótidos no presentaron cambios. Sin embargo dentro de estas poblaciones virales deberían existir genomas con cambios en los mapas de oligonucleótidos, pero pasaron desapercibidos debido a que son componentes minoritarios de la población viral. Con el objeto de analizar esta posibilidad, se segregaron las distintas subpoblaciones del pasaje BHK 15, mediante purificación por ensayo de placa (ver 3.2.2). Se tomaron 3 clones al azar con el mismo fenotipo que las población del pasaje BHK 15, y se analizaron los mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1. En uno de los mapas se observó la aparición de un oligonucleótido de más, comprobándose que la especie mayoritaria de la población tiene un mapa igual al del C3 clon a pesar de tener un fenotipo distinto, pero que existen otras especies minoritarias con el mismo fenotipo pero con un mapa distinto.

Esto sugiere que el C3 clon no posee un fenotipo antimutador, y que el fenómeno aquí observado es comparable al descrito por Sobrino et al. (50) tomando en cuenta las diferencias de los sistemas utilizados.

4.4 ¿QUÉ PRESIONES ACTÚAN EN LA SELECCIÓN DE VARIANTES DEL VFA?.

Algunos autores sugieren que las variantes del VFA son seleccionadas por el sistema inmune durante las rupturas de inmunidad que se producen en el campo, debido a que no son efectivamente neutralizadas en animales parcialmente inmunizados, o en animales convalescientes (43, 231-233, 235). Esta selección inmune podría ser la causante de la deriva antigénica del VFA, sin embargo en ocasiones como la descrita por Weddell et al. (74) para las cepas Aven76 y Aarg79 existen cepas estables en las que no se producen cambios en la región inmunogénica hipervariable de VP1 durante largos lapsos, que en este caso se prolongó por un periodo de 3 años entre los aislamientos.

Por otra parte, poblaciones virales de los subtipos A₅ (74) y A₁₂ (240) con una diferente historia de pasajes en el laboratorio, presentaron variaciones en la región inmunogénica hipervariable de VP1, como lo sucedido con la cepa C₃ Indaial secuenciada en Pirbright y en Ginebra (242). Estos cambios se produjeron sin presión del sistema inmune debido a que los pasajes se realizaron en cultivos de tejidos.

Si bien se pueden producir cambios importantes en las secuencias genómicas que provocan diferencias en la inmunogenicidad y virulencia durante las rupturas de inmunidad (por selección del sistema inmune), muchos otros cambios significativos se producen cuando el virus se mueve de un sistema celular a otro. Ejemplos de estos cambios se han establecido cuando el VFA pasa de bovinos a porcinos y nuevamente a bovinos (233, 280), o cuando virus adaptado y crecido en células BHK-21 infecta el ganado (281). Como fuera sugerido para la influenza

B, esta selección no inmune de variantes antigénicas conformaría un mecanismo potencial para la deriva antigénica (282). Además, Holland et al. (73) observaron cambios en la reacción de anticuerpos contra mutantes de VSV recobradas después de años de infección persistente en cultivos de células y en ausencia de anticuerpos. Esto es otra evidencia que la deriva antigénica no necesita de la presión selectiva del sistema inmune.

4.5 ¿POR QUÉ BUSCAR CAMBIOS EN VP1?

La alta variabilidad antigénica que presenta el VFA no se debe a una mayor frecuencia de mutación de este virus, ya que en experimentos "in vitro" con mutantes condicionales letales, se observó una frecuencia de mutación semejante a la de otros virus a RNA (283, 232). Las mutaciones no se distribuyen uniformemente a lo largo del genoma dado que un 83% se producen en las proteínas de la cápside, de las cuales el 90% se producen en VP1 y VP2 (283).

Mediante la aplicación de técnicas de biología molecular y clonado molecular, se estableció que dentro de VP1 existe una zona inmunigénica hipervariable entre los aminoácidos 130 y 170 (ver 1.8.4 y 1.8.9). Si bien dentro de VP1 existen zonas muy conservadas y zonas variables, al comparar las secuencias de distintas cepas, se sugirió que las diferencias entre los serotipos estaban dadas por los residuos en las regiones variables entre los aminoácidos 42-60 y 130-170. Las diferencias entre los subtipos son atribuibles a la región variable 130-170 (región hipervariable), porque dentro de un mismo serotipo existen aminoácidos idénticos entre las regiones variables 42-60 de los distintos subtipos que lo componen (242).

Al no encontrar cambios en los mapas bidimensionales de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares, se optó por buscar cambios en la región carboxilo terminal de VP1 utilizando el sistema de secuenciación rápida del cDNA (ver 2.14). En esta región

se encuentra la zona hipervariable de VP1, en la cual previamente se observaron cambios de secuencias importantes en el serotipo A, tanto por la selección del sistema inmune como por la de la célula huésped (74).

Weddell et al. (74) sugirieron que existiría un mecanismo adicional al de la poca fidelidad de la replicasa viral, que contribuiría con la proliferación de tipos y subtipos del VFA. Al comparar las secuencias de VP1 de distintas cepas del serotipo A, algunas de las cuales fueron aisladas del campo y otras obtenidas por pasajes en sistemas celulares, se observó que la región entre los codones 130 y 170 está sometida a un gran número de mutaciones. La secuencia nucleotídica de esa zona posee la potencialidad de formar una estructura secundaria estable que puede contribuir aumentando la frecuencia de mutación del gen. La polimerasa tendría dificultad en replicar esos sitios, que codifican para los determinantes antigénicos principales de la partícula viral, generando variantes. Esta ineficiente replicación del RNA en regiones de estructura secundaria, ha sido previamente reportada en el bacteriofago QB (241). Otra observación que contribuye con esta hipótesis es que en un solo pasaje por células BHK-21 de un VFA del subtipo A12, aislado de un bovino, se seleccionaron variantes con cambios en los aminoácidos 148 y 153 de VP1. Estas variantes presentaron una escasa habilidad de inducir anticuerpos neutralizantes cruzados (240). Esta observación apoyaría la hipótesis de que se produciría un mayor número de mutaciones en esa región, y que no sería necesaria la presión del sistema inmune para seleccionar nuevas variantes antigénicas. Cabría preguntarse si este fenómeno observado en el serotipo más variable del VFA (el serotipo A) podría generalizarse a los otros serotipos.

Diferencias significativas fueron observadas entre las secuencias de dos aislamientos de la cepa C₃ Indaial, una obtenida por el grupo de Pirbright de un aislamiento hecho en 1978, y la otra obtenida por Biogen de un aislamiento de 1971. No está claro si las diferencias ocurrieron en el campo o durante el mantenimiento de las cepas en el laboratorio. Sin embargo,

en la cepa secuenciada por Biogen se encontró una región con simetría bilateral, que potencialmente formaría una estructura secundaria de vástago-bucle en la región hipervariable de VP1 (242) (ver 3.5 y figura 18). Esta estructura podría correlacionarse con la estructura secundaria inductora de mutaciones del serotipo A.

Al secuenciar la región carboxiloterminale de VP1 del C3 clon, fue posible establecer que a pesar de existir cambios en algunos nucleótidos, la estructura de vástago-bucle tendería a conservarse (ver 3.5 y figura 18) y por lo tanto se trataría de una ventaja adaptativa (ver 1.6) de esta cepa.

4.6 ¿SE ENCUENTRAN RELACIONADOS LOS MECANISMOS DE VARIACION POR DERIVA ANTIGÉNICA Y POR SELECCIÓN DE LA CÉLULA HUÉSPED?

En estudios donde se utilizó virus tratado con tripsina, enzima que cliva específicamente la región inmunogénica de VP1 (284), y anticuerpos monoclonales contra secuencias de esa misma región, fue posible demostrar que la región inmunogénica está involucrada en la interacción entre la partícula viral y la célula (en la adsorción a la membrana celular) (285,286). El receptor viral probablemente cambia permitiendo que el virus se pegue y prolifere en un nuevo tipo celular con un receptor distinto, caso que debe suceder durante la transmisión de una especie animal a otra.

Esta hipótesis de que al producirse variaciones en el sitio antigénico principal de la partícula viral, también se producen variaciones en el sitio viral para el receptor celular, y que estas variantes, seleccionadas por el sistema inmune, no sólo se producen por errores al azar que comete la replicasa viral, sino que esos errores son provocados por la estructura secundaria del RNA, podría explicar la habilidad del VFA de adaptarse rápidamente a diferentes presiones selectivas y de crecer en un amplio rango de huéspedes.

Por lo tanto en base a la teoría esbozada anteriormente,

se produciría un mayor número de mutaciones en la región variable de VP1, que serían seleccionadas indistintamente por la presión del sistema inmune o por la presión que ejerce el huésped. Como la presión es sobre la misma zona genómica, al ejercerse la debida a la célula huésped, se seleccionarían variantes antigénicas (hecho demostrado experimentalmente), y al ejercerse la del sistema inmune, se seleccionarían variantes referentes al rango de huéspedes, o todas las combinaciones posibles entre los factores antes enunciados. Sin embargo esto no se produce en el C3 clon (ver más adelante).

4.7 ¿QUE SUCEDE DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL C3 CLON A TRAVES DE LOS PASAJES SERIADOS POR LOS DISTINTOS SISTEMAS CELULARES?.

Durante los pasajes del C3 clon por los distintos sistemas celulares, las poblaciones virales evolucionan independientemente en cada uno de ellos. Esto se manifiesta por los cambios fenotípicos observados (ver 3.1). Estos cambios no pudieron ser correlacionados con cambios en los mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1, probablemente debido a que las mutaciones ocurridas no se produjeron en ese 7% de los nucleótidos genómicos que pueden ser analizados por esta técnica (43). Por lo tanto, se optó por analizar la región carboxilo terminal de VP1 mediante secuenciación rápida del cDNA, pues cambios en esta zona fueron relacionados con variaciones en el rango de huéspedes y variaciones antigénicas (ver 4.5 y 4.6).

Al analizar las secuencias nucleotídicas de la región carboxiloterminale de VP1 del C3 clon, se comprobó la existencia de oligonucleótidos complementarios que originarían una estructura secundaria con simetría bilateral del tipo vástago-bucle (ver 3.5, 4.5 y figura 18). Esta estructura, previamente observada en la cepa C₃ Indaial, podría ser analoga con la observada en el serotipo A cuya consecuencia, en el ciclo de vida del virus, sería el incremento en los errores que cometería la polimerasa viral durante la replicación (74) (ver 4.5).

Al comparar las secuencias de la región carboxilo terminal de VP1 de las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares, pudo comprobarse que no se produjeron cambios. Por lo tanto no habría una tendencia a seleccionar variantes antigénicas por parte de los distintos sistemas huéspedes utilizados en este trabajo. Lo que sucede con este clon del serotipo C podría ser un mecanismo distinto al observado para el serotipo A. Pese a la existencia de una zona con estructura secundaria estable en la región hipervariable de VP1, que favorecería la producción de errores cometidos por la replicasa viral, no se observa la aparición de variantes antigénicas.

La estrecha relación entre la selección de variantes por el sistema inmune y por la célula huésped, con la mayor producción de mutaciones en la región hipervariable de VP1 (teoría esbozada en el punto 4.7) confieren al serotipo A un fenotipo mutador (ver 1.2), que no sería compartido por los otros serotipos del VFA, que por cierto son más estables que el A (ver 4.2).

Pese a la estructura secundaria que presenta la región hipervariable de VP1 del C3 clon, no se seleccionaron variantes antigénicas, pero sí se produjeron mutaciones y selecciones de variantes con otros fenotipos (ver 3.1). Esto pone en duda que este sea un mecanismo generalizado en el VFA. Sin embargo no puede descartarse que otras cepas del serotipo C puedan tener un fenotipo mutador de la clase presente en el serotipo A. Solamente el análisis de la distribución de mutaciones en otras cepas, actuales o que sean aisladas en el futuro, podrá aclarar este aspecto.

De la presente tesis Doctoral se desprenden las siguientes conclusiones:

1) En pocos pasajes seriados, de un virus clonado (C3 clon), por distintos sistemas celulares, se pone de manifiesto el efecto de la célula huésped en la producción y selección de variantes virales. Las distintas poblaciones obtenidas presentan un fenotipo distinto al del virus que les dio origen (C3 clon), en cuanto a cambios en el tiempo necesario para que se produzca el c.p.e. total, en la patogenicidad para RL, en la infectividad para células BHK-21 y en las masas virales producidas.

2) La rápida evolución que sufre el VFA durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares, es independiente de la m.o.i. empleada, ya que tanto con bajas m.o.i (50) como con altas m.o.i (en este trabajo), se produce una rápida aparición de variantes virales.

3) Durante los pasajes seriados del C3 clon por los distintos sistemas celulares, se evidencia una tendencia generalizada a reducir el tiempo en que se produce el c.p.e., disminuir la masa de viriones producida durante el ciclo de infección y aumentar la infectividad específica. Esta adaptación del virus al sistema celular podría interpretarse como una ventaja selectiva de aquellas poblaciones virales capaces de inducir un rápido c.p.e con una menor masa de partículas producidas. Esto podría deberse a la mayor toxicidad de los productos génicos virales.

4) No se observaron cambios en los mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a la RNasa T1, de los genomas pertenecientes a las distintas poblaciones virales, producidas durante los pasajes seriados por los cuatro sistemas celulares empleados en este trabajo, a pesar de existir cambios fenotípicos

en las poblaciones analizadas.

5) Es necesario segregar las poblaciones virales para encontrar cambios en los componentes minoritarios de la misma. Esto fue utilizado para demostrar que el C3 clon no posee un fenotipo antimutador, ya que al segregar las subpoblaciones del pasaje BHK 15 se detectó un cambio en un mapa de oligonucleótidos. Este cambio no se correlaciono con el fenotipo de atenuación para RL, ya que todas las subpoblaciones analizadas poseían el mismo fenotipo que la población sin segregar.

6) Al comparar las secuencias nucleotídicas de la región carboxilo terminal de VP1, de las cepas C₁ Obb. y C₃ Indaial con las del C3 clon, se determinó que el mayor número de cambios se produjo entre los aminoácidos 130 y 170. Se establece una vez más que esta es la región hipervariable de VP1, en la que residen los cambios que determinan las diferencias de subtipo y cepa.

7) La conservación de la estructura secundaria de tipo vástago-bucle, en la región carboxilo terminal de VP1 del C3 clon, previamente observada en la cepa C₃ Indaial (Biogen), sugiere que aporta ventajas selectivas. Esto podrá ser confirmado cuando se analicen otras cepas de este subtipo.


8) El aminoácido carboxilo terminal de VP1 del C3 clon es una serina, en vez de una leucina, como la encontrada en las aproximadamente 15 cepas del VFA hasta ahora secuenciadas. Esto sugiere que la enzima proteolítica que cliva la unión LEU(VP1)/ASN(P52) también cliva la unión SER(VP1)/ASN(P52). Sin embargo el hecho de que estos dos aminoácidos se encuentren conservados en la mayoría de las cepas del VFA, también sugeriría la posibilidad de un clivaje alternativo en alguna otra parte de P52, o la existencia de una proteasa capaz de clivar también la unión SER/ASN.

9) No se produjeron cambios en la región carboxilo terminal de VP1 de las distintas poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados. Esto sugiere que el fenómeno de selección de variantes antigénicas por la célula huésped, observado en el serotipo A del VFA y en otros virus, no se produce al utilizar el C3 clon. Por lo tanto se trataría de una característica propia del serotipo A del VFA, no extrapolable a los otros serotipos.

10) Las secuencias de la región hipervariable de VP1 se mantuvieron constantes en las poblaciones virales obtenidas durante los pasajes seriados por los distintos sistemas celulares. Esta región se comportó establemente, a pesar de la presencia de una estructura secundaria del tipo vástago-bucle, que aumentaría el número de errores que normalmente comete la replicasa viral en esa zona. Esto sugiere que a parte de la presencia de estructura secundaria y de los errores que normalmente comete la replicasa, debería existir algún otro mecanismo o característica responsable del fenotipo mutador del serotipo A del VFA.



Lic. Gerardo Kaplan



Dr. Eduardo L. Palma
Director de Tesis

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kimura, M. (1968). *Nature (London)* 217, 27.
2. Kimura, M. (1977). *Nature (London)* 267, 275.
3. Ii, W., Gojobori, T., and Nei, M. (1981). *Nature (London)* 292, 237.
Miyata, T. and Yasunaya, T. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 450.
5. Mundry, K., and Gierer, A. (1958). *Z. Verebungsl.* 89, 614.
6. Granoff, A. (1961). *Virology* 13, 402.
7. Domingo, E., Flavell, C., and Weissmann, C. (1976). *Gene* 1, 3.
8. Batschelet, E., Domingo, E., and Weissmann, C. (1978). *Gene* 1, 27.
9. Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T., and Weissmann, C. (1978). *Cell*, 13, 735.
10. Fowler, G., Degnen, E., and Cox, E. C. (1974). *Mol. Gen. Genet.* 133, 179.
11. Kunkel, T. A., and Loeb, L. A. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 9961.
12. Meselson, M., Pukkila, P., Peterson, J., Radman, M., and Wagner, J. (1980). *J. Supramol. Struct. Suppl.* 4, 311.
13. Coen, D. M., Furman, P. A., Gelep, P. T., and Schaffer, P. A. (1982). *J. Virol.* 41, 909.
14. Knopf, K. W., Kaufman, E. R., and Crumpacker, C. (1981). *J. Virol.* 39, 746.
15. Furman, P. A., Coen, D. M., St. Clair, M. H., and Schaffer, P. A. (1981). *J. Virol.* 40, 936.
16. Brutlag, D., and Kornberg, A. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 241.
17. Muzyczka, N., Poland, R. L., and Bessman, M. J. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 7116.
18. Lo, K. Y., and Bessman, M. J. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 2480.
19. Reha-Krantz, L. J., and Bessman, M. J. (1981). *J. Mol. Biol.* 145, 677.
20. Murray, V., and Holliday, R. (1981). *J. Mol. Biol.* 146,

- 55.
21. Chan, J. Y. and Becker, F. F. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 814.
 22. Hall, J. D., Coen, D. M., Fisher, B. L., Weisslitz, M., Randall, S., Almy, R., Gelep, P. T., and Schaffer, P. A. (1984). Virology 132, 26.
 23. Steinhauer, D. A., and Holland, J. J. (1986). J. Virol. 57, 219.
 24. Hollaud, J. J. (1984). Concepts in Viral Pathogenesis. Ed. Notkins, A. L., and Oldston, M. B. A. Spring-Verlag.
 25. King, A. M. Q., McCahon, D., Slade, W. R., and Newman J. W. I. (1982). Cell 29, 921.
 26. Tol'skaya, E. A., Ramonova, L. A., Kolensnikova, M. S., and Agol, V. I. (1983). Virology 124, 121.
 27. Agol, V. I., Drozdov, S. G., Prolova, M. P., Grachev, V. P., Kol'snikova, M. S., Kozlov, V. G., Ralph, N. M., Romanova L. I., Tol'skaya, E. A., and Viktorova, E. G. (1985). J. Gen. Virol. 65, 309.
 28. Racaniello, V. R. (1984). Virus Research 1, 669.
 29. Kohara, M., Omata, T., Kameda, A., Semler, B. L., Itoh, H., Wimmer, E., and Nomoto, A. (1985). J. Virol. 53, 786.
 30. La Monica, N., Meriam, C., and Racaniello, V. R. (1986). J. Virol. 57, 515.
 31. Fields, S., and Winter, G. (1982). Cell 28, 303.
 32. Palese, P. (1984). En "Concepts in viral pathogenesis". Notkins, A. L., and Oldstone, M. B. A. (eds.) p144. Spring-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
 33. Webster, R. G., Laver, W. G., Air, G. M., and Schild, G. C. (1982). Nature 296, 115.
 34. Holland, J., Spindler, K., Horodysky, F., Grabau, E., Nichol, S., and Vandepol, S. (1982). Science 215, 1577.
 35. Clewley, J. P., Bishop, D. H. L., Kang, C. Y., Coffin, J., Schitzlein, W. M., and Reichmann, M. E. (1977). J. Virol. 23, 152.

36. Kendal, A. P., Noble, G. R., Skehel, J. J., and Dowdle, W. R. (1978). *Virology* 89, 632.
34. Nakajima, K., Desselberger, U., and Palese, P. (1978). *Nature (London)* 274, 334.
38. Gibbs, A. (1984). Abstr. Sixth Int. Congr. Virol. p.12.
39. Eigen, M., and Schuster, P. (1979). En "A principle of Natural Self-Organization". Springer-Verlag, Berlin.
40. Domingo, E., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortin, J., López-Galíndez, C. Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., Vandepol, S., Steinhauer, D., DePolo, N., and Holland, J. (1985). *Gene* 40,1.
41. Young, J. F., Desselberger, U., and Palese, P. (1979). *Cell* 18, 73.
42. Nottay, B. K., Kew, O. M., Hatch, M. H., Heyward, J. T., and Obijeski, J. F. (1981). *Virology* 108, 405.
43. Domingo, E., Davila, M., and Ortin, J. (1980). *Gene* 11, 333.
44. King, A. M. Q., Underwood, B. O., McCahon, D., Newman, J. W. I., and Brown, F. (1981). *Nature (London)* 293, 479.
45. Takeda, N., Miyamura, K., Ogino, T., Natori, K., Yamazaki, S., Sakurai, N., Nakazono, N., Ishii, K., and Kono, R. (1984). *Virology* 134, 375.
46. Kew, O. M., Nottay, B. K., Hatch, M. H., Nakano, J. H., and Obijeski, J. F. (1981). *J. Gen. Virol.* 56, 337.
47. Brand, C., and Palese, P. (1980). *Virology* 107, 424.
48. Holland, J. J., Grabau, E. A., Jones, C. L., and Semler, B. L. (1979). *Cell* 16, 494.
49. Rowlands, D. J., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Brown, F., Nicholson, B. H., Bittle, J. L., Houghten, R. A., and Lerner, R. A. (1983). *Nature (London)* 306, 694.
50. Sobrino, F., Davila, M., Ortin, J., and Domingo, E. (1983). *Virology* 123, 310.
51. Spindler, K. R., Horodyski, F. M., and Holland, J. J. (1982). *Virology* 119, 96.

52. Younger, J. S., Jones, E. U., Kelly, M., and Frielle, D. W. (1981). *Virology* 108, 87.
53. Pringle, C. R., Devine, V., Wilkie, M., Preston, C. M., Dolan, A., and McGeoch, D. J. (1981). *J. Virol.* 39, 377.
54. Flamand, A. (1980). En "Rhabdoviruses". Bishop, D. H. L. (ed.) Vol. 2, p.115. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
55. Huang, A. S., and Baltimore, D. (1970). *Nature (London)* 226, 325.
56. von Magnus, P. (1954). *Adv Virus Res.* 2, 59.
57. Bellet, A., and Cooper, P. D. (1959). *J. Gen. Microb.* 21, 498.
58. Perrault, J., Semler, B., Leavitt, R., and Holland, J. (1978) En "Negative strand viruses and the host cell", Mahy, B., and Barry, R. (eds.). Academic Press, New York, p.527.
59. Perrault, J., and Semler, B. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6191.
60. Holland, J., Kennedy, S., Semler, B., Jones, C., Roux, L., and Grabau, E. (1980). *Compr. Virol.* 16, 137.
61. Holland, J., Semler, B., Jones, C., Perrault, J., Reid, L., and Roux, L. (1978). En "Persisten Viruses", Stevens, J., Todaro, G., and Fox, C. (Eds.). Academic Press, New York, p.57.
62. Weiss, B., and Schlesinger, S. (1981). *J. Virol.* 37, 840.
63. Jacobson, S., and Pfau, C. (1980). *Nature (London)* 283, 311.
64. Youngner, J. S., and Preble, T. O. (1980). En "Comprehensive virology", Conrat, F., and Wagner, R. R. (ed.). Vol. 16, p.73. Plenum Publishing Corp., New York.
65. Ahmed, R., Canning, W. M., Kauffman, R. S., Sharpe, A. H., Hallum, J. V., and Fields, B. M. (1981). *Cell* 25, 325.
66. Ron, D., and Tal, J. (1985). *J. Virol.* 55, 424.
67. Palese, P., and Young, J. F. (1982). *Science* 215, 1468.
68. Domingo, E., Dávila, M., and Ortín, J. (1980). *Gene* 11, 333.
69. Bachrach, H. (1968). *Annu. Rev. Microbiol.* 22, 201.

70. Harris, T., Doel, T., and Brown, F. (1977). *J. Gen. Virol.* **35**, 299.
71. Narayan, O., Griffin, D. E., and Chase, J. (1975). *Science* **197**, 376.
72. Young, J. F., and Palese, P. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6547.
73. Holland et al. (1980). En "Animal Virus Genetics". Fields, B., Jaenish, R., and Fox, C. (eds.). Academic Press, New York, p. 695.
74. Weddell, G. N., Yansura, D. G., Dowbenko, D. J., Hoatlin, M. E., Grubman, M. J., Moore, D. M., and Kleid, D. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2618.
- von Magnus, P. (1951). *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **29**, 156.
76. Brand, C., and Palese, P. (1980). *Virology* **107**, 424.
77. Youngner, J., Jones, E., Kelly, M., and Frielle, D. (1981). *Virology* **108**, 87.
78. Printz, P. (1970). *Ann. Inst. Pasteur, Paris* **119**, 520.
79. Mudd, J. A., Leavitt, R. W., Kingsbury, D. T., and Holland, J. J. (1973). *J. Gen. Virol.* **20**, 341.
80. Alexander, H. E., Koch, G., Mountain, I. M., Sprunt, K., and Van Damme, O. (1958). *Virology* **5**, 172.
81. Colter, J. S., Bird, H. H., and Brown, R. A. (1957). *Nature* **179**, 859.
82. Baltimore, D., Franklin, R. M., and Callender, J. (1963). *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 425.
83. Montagnier, L., and Sanders, F. K. (1963). *Nature* **199**, 664.
84. Jacobson, M., and Baltimore, D. (1968). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 77.
85. Dick, E. C., and Chesney, P. J. (1981). En "Textbook of pediatric infectious diseases, Feigin, R. D., and Chesney, J. D. (eds.). p. 1167. W. B. Saunders, Philadelphia.
86. Gwaltney, J. M. (1982). En "Viral infections of humans: Epidemiology and Control". Evans, A. S. (ed.). p.491. Plenum, New York.

87. Kapikian, A. Z. (1969). En "Diagnostic procedures for viral and rickettsial disease". 4th edn. Lennet, E. H., and Schmit, N. J. (eds.), p.603. American Public Health Association New York.
88. Kapikian, A. Z. (1971). *Virology* 43, 524.
89. Matthews, R. E. F.(1982). *Intervirolgy* 17, 1.
90. Newman, J. F. E., Rowlands, D. J., Brown, F., Goodridge, D., Burrows, R., and Steck, F. (1977). *Intervirolgy* 8, 145.
91. Plummer, G. (1965). *Prog. Med. Virol.* 7, 326.
92. Moore, N. F., and Tinsley, T. W. (1982). *Arch. Virol.* 72, 229.
93. Longworth, J. F. (1978). *Adv. Virus Res.* 23, 103.
94. Scotti, P. D., Longworth, J. F., Plus, N., Croizier, G., and Reinganum, C. (1981). *Adv. Virus Res.* 26, 117.
95. Graves, J. H. (1973). *Nature* 245, 314.
96. Loeffler, F., and Frosch, P. (1898). Report of the commission for Research on Foot-and-Mouth Disease. *Centralbl. Bakt. Parasit. Infekt. Part 1*,23, 371. Reeditado traducido (1964) en "Selected Papers on Virology", Hahon, N. (ed.), p. 64. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.
97. Fracastorius, H. (1546). *De Contagione et Contagiosis Morbis et Curatione*, Bk. 1, Chap. 12. Venecia.
98. Shahan, M. S. (1962). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 101, 44.
99. Moore, D. M. (1983). En "Genetic Engineering: Applications to agriculture. Owens, L. D. (ed.). Rowman and Allanheld, Totowo.
100. Brooksby, J. B.(1982). *Intervirolgy* 18, 1.
101. Pereira, H. G. (1977). En "Proceedings International Symposium on Foot-and-Mouth Disease (II), Lyon, France, 1976". Mackowiak, C., and Regancy, R. H. (eds.). *Develop. Biol. Standard* 35, 167. S. Karger, Basel.
102. Della-Porta, A. J. (1983). *Aust. Vet. J.* 60, 129.
103. Graves, J. H. (1963). *J. Immunol.* 91, 251.
104. van Bekkum, J. G. (1966). *Bull. Office Intern. Epizoot.*

- 65, 439.
105. Srubar, B. (1966). *Vet Med. Prague* 11, 551.
 106. Polacino, P., Kaplan, G., and Palma, E. L. (1985). *Arch. Virol* 86, 291.
 107. Polacino, P., Kaplan, G., Yafal, A. G., and Palma, E. L. (1986). *Arch. Virol.* 88, 143.
 108. Rivenson, S. (1979). Las vacunas oleosas en medicina veterinaria. *Rev. Med. Vet.* 60, 1.
 109. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease Report of the 24th session (FAO Rome, April 1981).
 110. Laporte, J., and Lenoir, G. (1973). *J. Gen. Virol.* 20, 161.
 111. Laporte, J., Grosclaude, J., Wantyghen, J., Bernard, S., and Rouze, P. (1973). *C. R. Acad. Sci.* 276, 3399.
 112. Bachrach, H. L., Moore, D. M., McKercher, P. D., and Polatnic J. (1975). *J. Immunol.* 115, 1636.
 113. Bachrach, H. L., Morgan, D. O., McKercher, P. D., Moore, D. M., and Robertson, B. H. (1982). *Vet. Microbiol.* 7, 85.
 114. Kaaden, O. R., Adam, K. H., and Strohmaier, K. (1977). *J. Gen. Virol.* 34, 397.
 115. Bachrach, H. L., Morgan, D. O., and Moore, D. M. (1979). *Intervirology*. 12, 65.
 116. Boothroyd, J. C., Highfield, P. E., Cross, G. A. M., Rowlands D. J., Lowe, P. A., Brown, F., and Harris, T. J. R. (1981) *Nature (London)* 290, 800.
 117. Kleid, D. G., Yansura, D., Small, B., Dowbenko, D., Moore, D. M., Grubman, M. J., Morgan, D. O., Robertson, B. H., and Bachrach, H. L. (1981). *Science* 214, 1125.
 118. Küpper, H., Keller, W., Kurz, C., Forss, S., Schaller, H., Franze, R., Strohmaier, K., Marquardt, O., Zaslavsky, V. G., and Hofschneider, P. H. (1981). *Nature (London)* 298, 555.
 119. Robertson, B. H., Moore, D. M., Grubman, M. J., and Kleid, D. G. (1983). *J. Virol.* 46, 311.
 120. Parry, N. R., Ouldrige, E. J., Barret, P. V., Rowlands,

- D. J., Brown, F., Bittle, J. L., Houghten, R. A., and Lerner, R. A. (1985). En "Molecular and Chemical Basis of Resistance to Parasitic, Bacterial, and Viral Diseases, p.211. Cold Spring Harbor.
121. Melen, R. H., and Barteling, S. J. (1986). Gen. Virol. 67, 289.
 122. Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Schinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., Lerner, R. A., Rowlands, D. J., and Brown, F. (1982). Nature (London) 298, 30.
 123. Pfaff, E., Mussgay, M., Bohn, H. O., Schultz, G. E., and Schaller, H. (1982). EMBO J. 1, 869.
 124. Yansura, D. G., Dowbwnco, D., Weddell, G. N., Hoatlin, M. E., Shire, S. J., Bock, L. A., Patzer, E. J., Kleid, D. K. Moore, D. M., Robertson, B. H., Grubman, M. J., Morgan, D. O., and Mckercher, P. D., (1983). Miami Winter Symp. 20, 479.
 125. Brown, F. (1985). Biotechnol. 3, 445.
 126. Di Marchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T., Mowat, N. (1986). Science 232, 639.
 127. Chatterjee, N. K., Bachrach, H. L., and Polatnick, J. (1976) Virology 69, 369.
 128. Grubman, M. J. (1980). Arch. Virol. 63, 311.
 129. Sangar, D. V., Rowlands, D. J., Harris, T. J. R., and Brown, F. (1977). Nature (London) 268, 648.
 130. Black, D. N., Stephenson, P., Rowlands, D. J., and Brown, F. (1979). Nucleic Acids Res. 6, 2381.
 131. Harris, T. J. R., Robson, K. J. H., and Brown, F. (1980). J. Gen. Virol. 50, 403.
 132. Rowlands, D. J., Harris, T. J. R., and Brown, F. (1978). J. Virol. 26, 335.
 133. Spector, D. H., and Baltimore, D. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2983.
 134. Hruby, D. E., and Roberts, W. K. (1976). J. Virol. 19, 325.
 135. Yogo, Y., and Wimmer, E. (1975). J. Mol. Biol. 92, 467.
 136. Wimmer, E. (1982). Cell, 199-201.

137. Forss, S., and Schaller, H. (1982). *Nucleic Acids Res.* 10, 6441.
138. King, A. M. Q., Sangar, D. V., Harris, T. J. R., and Brown, F. (1980). *J. Virol.* 34, 627.
139. Harris, T. J. R., and Brown, F. (1976). *J. Gen. Virol.* 33, 493.
140. Rowlands, D. J., Harris, T. J. R., and Brown, F. (1978). *J. Virol.* 26, 335.
141. Newton, S. E., Carroll, A. R., Campbell, R. O., Berwyn, E. C., and Rowlands, D. J. (1985). *Gene* 40, 331.
142. Costa Giomi, M. P., Bergmann, I. E., Scodeller, E. A. Auge de Mello, P., Gomez, I., and La Torre, J. L. (1984). *J. Virol.* 51, 799.
143. Sangar, D. V., Black, D. N., Rowlands, D. J., Harris, T. J. R., and Brown, F. (1980). *J. Virol.* 33, 59.
144. Kitamura, N., Semler, B. L., Rothberg, P. G., Larsen, G. R., Adler, C. J., Dorner, A. J., Emini, E. A., Hanecak, R., Lee, J. J., vanderWerf, S., Anderson, C. W., and Wimmer, E. (1981). *Nature (London)* 291, 547.
145. Palmenberg, A. C., Kirby, E. M., Janda, M. R., Drake, N. L., Duke, G. M., Potratz, K. F., and Collett, M. S. (1984). *Nucleic Acids Res.* 12, 2969.
146. Robertson, B. H., Grubman, M. J., Weddell, G. N., Moore, D. M., Welsh, I. D., Fisher, T., Dowbwnko, D. J., Yansura, D. G., Small, B., and Kleid, D. G. (1985). *J. Virol.* 54, 651.
147. Forss, S., and Schaller, H. (1982). *Nucleic Acids Res.* 10, 6441.
148. Grubman, M. J., and Baxt, B. (1982). *Virology* 116, 19.
149. Klump, W., Marquardt, O., Hofschneider, P. H. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3351.
150. Doel, T. R., Sangar, D. V., Rowlands, D. J., and Brown, F. (1978). *J. Gen. Virol.* 41, 395.
151.
151. Robertson, B. H., Morgan, D. O., Moore, D. M., Grubman,

- M. J., Card, J., Fisher, T., Weddell, G., Dowbwnko, D., and Yansura, D. (1983). *Virology* 126, 614.
152. Rueckert, R. R., and Wimmer, E. (1984). *J. Virol.* 50, 957.
153. McLean, C., Mattheus, T. J., and Rueckert, R. R. (1976). *J. Virol* 19, 903.
154. Rueckert, R. R., Mattheus, T. J., Kew, O. M., pallonsch, M., McLean, C., and Omilianowski, D. (1979). En "The Molecular Biology of Picornaviruses", Perez-Bercoff, R. (ed.), p 113. Plenum Press, New York and London.
155. Adams, S. P. (1983). *J. Am. Soc.* 105, 661.
156. Butterworth, B. E., Hall, L., Stoltzfus, C. M., and Rueckert, R. R. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 3083.
157. Butterworth, B. E., and Rueckert, R. R. (1972). *Virology* 50, 535.
158. Semler, B. L., Anderson, C. W., Kitamura, N., Rothberg, P. G., Wishart, W. L., and Wimmer, E. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3464.
159. Hanecak, R., Semler, B. L., Anderson, C. W., and Wimmer, E. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3973.
160. Saunders, K., and King, A. M. Q. (1982). *J. Virol.* 42, 389.
161. Anderson-Sillman, K., Bartel, S., and Tershak, D. C. (1984). *J. Virol.* 50, 922.
162. Kurz, C., Forss, S., Küpper, H., Strohmaier, K., and Schaller H. (1981). *Nucleic Acids Res.* 9, 1919.
163. Forss, S., Strebel, K., Beck, E., and Schaller, H. (1984). *Nucleic Acids Res.* 12, 6587.
164. Carroll, A. R., Rowlands, D. J., and Clarke, B. E. (1984). *Nucleic Acids Res.* 12, 2461.
165. Beck, E., Forss, S., Strebel, K., Cattaneo, R., and Feil, G. (1983). *Nucleic Acids Res.* 11, 7873.
166. Bachrach, H. L., Swaney, J. B., and vandewoude, G. F. (1973). *Virology* 52, 520.
167. Matheka, H. D., and Bachrach, H. L. (1975). *J. Virol.* 16, 1248.
168. Strohmaier, K., Wittman-Liebold, B., and Geissler, A. W.

- (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 1640.
169. Strebel, K., Beck, E., Strohmaier, K., and Schaller, H. (1986). *J. Virol.* 57, 983.
170. Kozak, M. (1981). *Nucleic Acids Res.* 9, 5233.
171. Pallansch, M. A., Kew, O. M., Palmenberg, A. C., Golini, F., Wimmer, E., and Rueckert, R. R. (1980). *J. Virol.* 35, 414.
172. Grubman, M. J., Robertson, B. H., Morgan, D. O., Moore, D. M., and Dowenko, D. (1984). *J. Virol.* 50, 579.
173. Yin, F. H., and Lomax, N. B. (1983). *J. Virol.* 48, 410.
174. Rueckert, R. R. (1976). En "Comprehensive Virology, Vol. 6", Fraenkel-Conrat H., and Wagner, R. R. (eds.), p 131. Plenum, New York.
175. Vasquez, C., Denoya, C. D., La Torre, J. L., and Palma, E. L. (1979). *Virology* 97, 195.
176. vandeWoude, G. F., Swaney, J. B., and Bachrach, H. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1222.
177. Bachrach, H. L. (1977). En "Beltsville Symposia in Agricultural Research. I. Virology in Agriculture", Romberger, J. A. (ed.), p3. Allanheld, Osmun, Montclair, N. J.
178. Talbot, P., and Brown, F. (1972). *J. Gen. Virol.* 15, 163.
179. Mak, T. W., Colter, J. S., and Scraba, D. G. (1974). *Virology* 57, 543.
180. Mak, T. W., O'Callaghan, D. J., and Colter, J. S. (1970). *Virology* 40, 565.
181. Rueckert, R. R., Dunker, A. K., and Stoltzfus, C. M. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 912.
182. Wild, T. F., Burroughs, J. N., and Brown, F. (1969). *J. Gen. Virol.* 4, 313.
183. Cavanagh, D., Sangar, D., Rowlands, D. J., and Brown, F. (1977). *J. Gen. Virol.* 35, 149.
184. Dernick, R., Heukeshoven, J., and Hilbrig, M. (1983). *Virology* 130, 243.
185. Lund, G. A., Ziola, B. R., Salmi, A., and Scraba, D. G. (1977). *Virology* 78, 35.

186. Van der Marel, P., Hazandonk, T. G., Heneke, M. A. C., and van Wezel, A. L. (1983). *Vaccine* 1, 17.
187. Lonberg-Holm, K., and Butterworth, B. E. (1976). *Virology* 71, 207.
188. Miller, R. L., and Flagemann, P. G. W. (1974). *Virology* 13, 729.
189. Wetz, K., and Habermehl, K. O. (1982). *J. Gen. Virol.* 59, 397.
190. Hogle, J. M., Chow, M., and Filman, D. J. (1985). *Science* 229, 1358.
191. Rossmann, M. G., Arnold, E., Erickson, J. W., Frankenberger, E. A., Griffith, J. P., Hecht, H. J., Johnson, J. E., Kamer, G., Luo, M., Mosser, A. G., Rueckert, R. R., Sherry, B., and Vriend, G. (1985). *Nature* 317, 12 September.
192. Hall, L., and Rueckert, R. (1971). *Virology* 43, 152.
193. Cavanagh, D., Rowlands, D. J., and Brown, F. (1978). *J. Gen. Virol.* 41, 255.
194. Dales, S. (1962). *J. Cell. Biol.* 13, 303.
195. Crowell, R. L., and Landau, B. J. (1983). En "Comprehensive Virology, Vol. 18", Fraenkel-Conrat H., and Wagner, R. R. (eds.) p.1. Plenum, New York.
196. Lonberg-Holm, C. (1980). En "Receptors and Recognition. Series B, Vol 8: Virus Receptors. Part 2, Animal Viruses", Lonberg-Holm, K., and Philipson, L. (eds.), p.1. Chapman and Hall, London.
197. Guttman, N., and Baltimore, D. (1977). *Virology* 82, 25.
198. Holland, J. J., and Hoyer, B. H. (1962). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27, 101.
199. Palmenberg, A. C., and Rueckert, R. R. (1982). *J. Virol.* 41, 244.
200. Nomoto, A., Detjen, B. M., Pozzatti, R., and Wimmer, E. (1977). *Nature* 268, 208.
201. Van Dyke, T. A., Rickles, R. J., and Flanagan, J. B. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 4610.
202. Kaplan, G., Lubinski, J., Dasgupta, A., and Racaniello,

- V. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 8424.
203. Sangar, D. V. (1979). J. Gen. Virol. 45, 1.
204. Nomoto, A., Lee, Y. F., and Wimmer, E. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 375.
205. Hewlett, M. J., Rose, J. K., and Baltimore, D. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 327.
206. Flanagan, J. B., Pettersson, R. F., Ambros, V., Hewlett, M. J., and Baltimore, D. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 961.
207. Ambrose, V., and Baltimore, D. (1980). J. Biol. Chem. 255, 6739.
208. Baltimore, D., Girard, M., and Darnell, J. E. (1966). Virology 29, 179.
209. Denoya, C. D., Scodeller, E. A., Vasquez, C., and La Torre, J. L. (1978). Virology 89, 67.
210. Franklin, R. M., and Baltimore, D. (1962). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 175.
211. Lucas-Lenard, J. M. (1979). En "The Molecular Biology of Picoraviruses", Perez-Bercoff, R. (ed.), p.73. Cambridge University Press, New York.
212. Traub, V., and Traub, P. (1978). Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 359, 581.
213. Grigera, P. R., and Tisminetsky, S. G. (1984). Virology 136, 10.
214. Bablanian, R., Eggers, H. J., and Tamm, I. (1965). Virology 26, 114.
215. Etchison, D., Hansen, J., Ehrenfeld, E., Edery, I., Sonenberg N., Milburn, S., and Hershey, J. W. B. (1984). J. Virol. 51, 832.
216. Etchison, D., Milburn, S. C., Edery, I., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B. (1982). J. Biol. Chem. 257, 14806.
217. Lloyd, R. E., Etchison, D., and Ehrenfeld, E. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2723.
218. Jen, G., and Thach, R. E. (1982). J. Virol. 43, 250.

219. Guttman, N., and Baltimore, D. (1977). *J. Virol.* 23, 363.
220. McGregor, S., Hall, L., and Rueckert, R. R. (1975). *J. Virol.* 15, 1107.
221. Mayer, M. M., Rapp, H. J., Roizman, B., Klein, S. W., Cowan, K. M., Lukens, D., Schwerdt, C. E., Schaffer, F. L., and Charney, J. (1957). *J. Immunol.* 78, 435.
222. Jacobson, M., and Baltimore, D. (1968). *J. Mol. Biol.* 33, 369.
223. Dietzschold, B., Kaaden, O. R., Tokni, T., and Bohm, O. (1971). *J. Gen. Virol.* 13, 1.
224. Dietzschold, B., Kaaden, O. R., and Ahl, R. (1972). *J. Gen. Virol.* 15, 171.
225. Robson, K. J. H., Harris, T. J. R., and Brown, F. (1977). *J. Gen. Virol.* 37, 271.
226. Frisby, D. P., Newton, C., Carey, N. H., Fellner, P., Newman, J. F. E., Harris, T. J. R., and Brown, F. (1976). *Virology* 71, 379.
227. Robson, K. J. H., Growther, J. R., King, A. M. Q., and Brown, F. (1979). *J. Gen. Virol.* 45, 579.
228. Robson, K. J. H., Doel, T. R., Gorman, B. M., and Brown, F. (1980). *J. Gen. Virol.* 46, 179.
229. Marquardt, O. (1982). *J. Gen. Virol.* 59, 283.
230. Villanueva, N., Dávila, M., Ortín, J., and Domingo, E. (1983) *Gene* 23, 185.
231. Martínez-Salas et al. 1985.
232. McCahon, D. (1981). *Arch. Virol.* 69, 1.
233. Ouldrige, E. J., Head, M., Buck, H., and Rweyemamu, M. M. (1982). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 1, 119.
234. Hyslop, N. St. G., and Flagg, R. H. (1965). *J. Hyg.* 63, 357.
235. Coean, K. M., Erol, N., and Whiteland, A. P. (1974). *Bull. Off. Int. Epizoot.* 81, 1271.
236. Brooksby, J. B. (1982). *Intervirolgy* 18, 1.
237. Bachrach, H. L. (1978). En "Viruses and Environment" Maramorosch, K., and Kurstak, E. (eds.) p. 229. Academic, New

York.

238. Rewyemamu, M. M., and Ouldridge, E. J. (1982). Bull. Inst. Pasteur (Paris) 80, 157.
239. Casas Olascoaga, R., Sutmöller, P., Fernandez, A. A., and Abaracon, D. (1982). Sixteen Conference of the Foot and Mouth Disease Commission (Office of International Epizooties, Paris, France) p.109.
240. Rowlands, D. J., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Brown, F., Nicholson, B. H., Bittle, J. L., Houghten, R. A., and Lerner, R. A. (1983). Nature (London) 306, 694.
241. Mills, D. R., Kramer, F. R., and Spiegelman, S. (1973). Science 180, 916.
242. Cheung, A., DeLamarter, J., Weiss, S., and Küpper, H. (1983). J. Virol. 48, 451.
243. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
244. Palese, P., and Schulman, J. L. (1976). J. Virol. 17, 876.
245. Darby, G., and Minson, A. C. (1973). J. Gen. Virol. 21, 285.
246. Scholtissek, C., Harms, E., Rohde, W., Orlich, M., and Root, R. (1976). Virology 74, 332.
247. Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M. R. (1984). Nucleic Acids Res. 12, 7035.
248. de Watchter, R., and Fiers, W. (1972). Anal. Biochem. 49, 184.
249. Flavell, R. A., Sabo, D. L., Bandle, E. F., and Weissmann, C. (1974). J. Mol. Biol. 89, 255.
250. Donis-Keller, H., Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1977). Nucleic Acids Res. 8, 2527.
251. Peattie, P. A. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1760.
252. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463.
253. Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1980). Methods in Enzymology 65, 449.

254. Stoker, M., and McPherson, H. 1964. *Nature* 203, 1355.
255. de Castro, J., and Koseki, L. 1967. *Arq. Inst. Biol. Sao Paulo* 34, 285.
256. Mowat, G. N., and Chapman, W. G. 1962. *Nature* 194, 253.
257. Reed, L. J., and Muench, H. 1938. *Am. J. Hyg.* 27, 493.
258. Adler, E. 1967. En "Manual de fijación de complemento para serología de fiebre aftosa", Inst. Nac. Tec. Agrop. (INTA), Bs. As., Argentina.
259. Gómez Yafal, A., and Palma, E. L. 1979. *J. Virol.* 30, 643.
260. Denoya, C. D., Scodeller, E. A., Giménez, B. H., Vásquez, C., and La Torre, J. L. 1978. *Virology* 84, 230.
261. Maniatis, T., Hardison, R. C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, D. K., and Efstratiadis, A. 1978. *Cell* 15, 687.
262. La Torre, J. L., Underwood, B. O., Labendiker, M., Gorman, B. M., and Brown, F. 1982. *Infect. Immun.* 36, 142.
263. Klein, R. D., Selsing, E., and Wells, R. D. 1980. *Plasmid* 3, 1060.
264. Ghosh, P. K., Reddy, V. B., Piatak, M., Lebowitz, P., and Weissman, S. M. 1980. *Methods in Enz.* 65, 580.
265. Yewdell, J. W., and Gerhard, W. 1981. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 185.
266. Almond, S. W., Stanway, G., Cann, A. J., Westrop, G. D., Evans, D. M. A., Ferguson, M., Minor, P. D., Spitz, M., and Schild, G. C. 1984. *Vaccine* 2, 177.
267. Wunner, W., Dietzschold, B., Smith, C. L., Lafon, M., and Golub, E. 1985. *Virology* 140, 1.
268. Ray, V. R., Aulaesh, G. S., Shubert, M., McClintock, P. R., Yoon, J. W., and Notkins, A. L. 1983. *J. Gen. Virol.* 64, 947.
269. Spriggs, D. R., and Fields, B. 1982. *Nature* 297, 68.
270. Dietzschold, B., Wunner, W. H., Wilator, T. J., Lopes, A. D., Lafon, M., Smith, C. L., and Koprowski, H. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 70.

271. Reagan, K. J., Goldberg, B., and Crowell, R. L. 1984. *J. Virol.* 49, 635.
272. Thiele, D. J., Hanning, E. A., and Leibowitz, M. J. 1984. *Virology* 137, 20.
273. Bruenn, J. A., and Brennan, V. E. 1980. *Cell* 19, 923.
274. Franssen, H., Lewnissen, J., Goldbach, R., Lomonossoff, G., and Zimmer, D. 1984. *EMBO J.* 3, 855.
275. Haseloff, J., Godet, P., Zimmer, D., Ahlquist, P., Dasgupta, R., and Kaesberg, P. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4358.
276. Argos, P., Kamer, G., Nicklin, M. J., and Wimmer, E. 1984. *Nucleic Acids Res.* 12, 7251.
277. Kamer, G., and Argos, P. 1984. *Nucl. Acids Res.* 12, 7269.
278. Ahlquist, P., Strauss, E. G., Rice, C. M., Strauss, J. H., Haseloff, J., and Zimmer, D. 1985. *J. Virol.* 53, 536.
279. Morgan, D. O., Bachrach, H. L., and McKercher, P. D. 1969. *Appl. Microbiol.* 17, 441.
280. Kubin, G., Al-Nuktah, M., and Silber, R. 1982. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 1, 415.
281. King, A.M.Q., McCahon, D., Newman, J. W. I., Crowther, J. R., and Carpenter, W. J. 1983. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 104, 219.
282. Schield, G. L., Oxford, J. S., de Jong, J. C., and Webster, R. G. 1983. *Nature (London)* 303, 706.
283. McCahon, D., Slade, R. W., Priston, R. A., and Lake, J. R. 1977. *J. Gen. Virol.* 35, 555.
284. Bachrach, H. L., Morgan, D. O., McKercher, P. D., Moore, D. M., and Robertson, B. H. 1982. *Vet. Microbiol.* 7, 85.
285. Baxt, B., Bachrach, H. L. 1982. *Virology* 116, 391.
286. Baxt, B., Morgan, D. O., Robertson, B. H., and Timpone, C. A. 1984. *J. Virol.* 51, 298.
287. Harris, T. J. R., and Brown, F. 1977. *J. Gen. Virol.* 34, 87.
288. Harris, T. J. R., and Brown, F. 1976. *Virology* 71, 379.

289. Keese, P., and Symons, R. H. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4582.
290. Eagle, H. 1959. Science 130, 432.
291. Dulbecco, R., and Freeman, G. 1959. Virology 8, 396.