

Tesis Doctoral

Diseño de un sistema de genética reversa del virus de la fiebre aftosa

Giraldez, Adrián Nicolás

2013-11-19

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:

Giraldez, Adrián Nicolás. (2013-11-19). Diseño de un sistema de genética reversa del virus de la fiebre aftosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Giraldez, Adrián Nicolás. "Diseño de un sistema de genética reversa del virus de la fiebre aftosa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-11-19.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Diseño de un sistema de genética reversa del virus de la fiebre aftosa

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Química Biológica

Adrián Nicolás Giraldez

Director de tesis: Nora Marta Mattion

Director Asistente: Viviana Malirat

Consejero de estudios: Eduardo Tomás Cánepa

Lugar de trabajo: Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein-CONICET

Buenos Aires, 2013

Diseño de un sistema de genética reversa del virus de la fiebre aftosa

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo generar un sistema para ser utilizado como herramienta en técnicas de genética reversa vinculadas al estudio del virus de la Fiebre Aftosa. Se diseñó y construyó un clon basado en una copia en ADN del genoma completo de la cepa O1/Campos, que se transcribe a partir del promotor de la polimerasa del fago T7. A pesar de detectar replicación del genoma viral por identificación de ARN de cadena negativa en las células transfectadas y en pasajes sucesivos de éstas, no se observó generación de efecto citopático en células BHK-21. Se valoró la influencia de algunos cambios en nucleótidos sobre esta incapacidad, tales como mutaciones en la secuencia amino acídica, estructura secundaria del ARN, estructura secundaria y terciaria de las proteínas involucradas, y se generaron reversiones de las mutaciones que se consideraron más importantes. Se desarrolló un sistema de cuantificación de ARN viral por RT-PCR en Tiempo Real. Por otro lado, se generaron dos replicones mediante el remplazo parcial o completo de las proteínas de la cápside viral por el gen reportero Luc, incapaz de generar virus infeccioso, de modo de poder realizar estudios en laboratorios de nivel bioseguridad menos estrictos. Este sistema puede usarse para el estudio funcional de las proteínas no estructurales del virus, así como de las regiones 5' y 3' no codificantes. Se detectó replicación por identificación de ARN de cadena negativa en las células transfectadas así como traducción de proteínas virales por medio de técnicas de inmunofluorescencia indirecta.

Palabras clave: Virus de la Fiebre Aftosa, genética reversa, clon infeccioso, replicón, ingeniería genética.

Design of a reverse genetic system for foot-and-mouth disease virus

ABSTRACT

The aim of the present work was to build a reverse genetic system for the molecular study of Foot-and-mouth Disease virus (FMDV). A full-length cDNA clone based on the genomic sequence of O1/Campos strain was cloned downstream of the T7 polymerase promoter. Genomic RNA was transcribed *in vitro* from this clone after linearization of the plasmid cDNA. Although replication of the viral genome was confirmed through the detection of negative strand RNA in transfected cells and subsequent passages, cytopathic effect on BHK-21 cells was not observed. The influence of nucleotide changes on this phenotype, such as aminoacid changes, RNA secondary structure, protein secondary and tertiary structure, were carefully analyzed, and several reversion mutations were carried out. A Real Time RT qPCR assay to quantify FMDV RNA was developed. In a second step of this work, two replicons derived from the full length clone were constructed by partial or complete replacement of the sequences encoding the viral capsid proteins with those of the Luc gene. These replicons have the advantage that they are unable to generate infectious virus, and therefore require less strict biosecurity conditions. This system can be used for the study of the role of FMDV nonstructural proteins and the 5' and 3' UTRs during viral replication. Replication of the constructs was confirmed in transfected cells through detection of negative strand RNA by RT-PCR and detection of translation of viral proteins by indirect immunofluorescence techniques.

Keywords: Foot and Mouth Disease Virus, reverse genetics, infectious clone, replicon, genetic engineering.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que de una forma u otra hicieron posible la realización de esta Tesis:

Al Dr. José La Torre, por haberme brindado un lugar en el Instituto ICT Milstein para desarrollar allí mi tesis doctoral, y por haberme apoyado con la beca FEVAN durante la última etapa de este trabajo.

A la directora de esta tesis, la Dra. Nora Mattion, por haberme dado la oportunidad de realizar mi doctorado en su laboratorio, y por su apoyo.

A la directora asistente de esta tesis, la Dra. Viviana Malirat, por su colaboración en la elaboración de la misma.

Al Dr. Maximiliano Wilda por su ayuda en la realización de los modelados de proteínas.

A la gente del instituto: Daniel, Gabriela, Olga, Flavia, Florencia, Paula, Lorena, Carina, Leticia, Marina, Horacio, Verónica, Eugenia, Sabrina, Anita, Alejandra, Nora, Marcelo, Angy, Juan Manuel, Mauro, Lorena O., Sebastián, Alvina, Blanca, Osvaldo, Pablo, Ingrid, Margarita, Carina, Miriam, María, Carmen, Marita, Mónica, Cristina, Irma, Inés, Silvia, Nora, Sandra y otros que seguramente me estoy olvidando, por su compañerismo, por los momentos vividos y porque de todos se aprende algo. Y en particular a Maxi y a Carlos, por su colaboración desinteresada y por su amistad, que es lo más valioso.

A Alejandro, Sebastián y Santiago por nuestras cenas de camaradería, llenas de risas y chistes.

A aquellos que de una forma u otra me brindaron un gran apoyo durante la realización de esta tesis: Alicia, Ángel, Orson, Alejandra, Mariano, Gustavo, Solange y Enrique Ortiz.

Y muy especialmente a mis padres, por apoyarme incondicionalmente siempre.

A todos ellos, muchas gracias.

Reconocimientos: La realización de esta tesis se llevó a cabo con el apoyo financiero del FONCyT y del FEVAN.

Les dedico esta tesis a mis padres, Alberto Enrique Giraldez y María Luz de León. Porque son los únicos que de una forma u otra siempre están ahí... Y por quererme así... piantao... piantao, piantao.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ABREVIATURAS, SIGLAS Y TÉRMINOS UTILIZADOS	XVII
CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS DE LOS AMINOÁCIDOS	XX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La fiebre aftosa.	1
1.1.1. La enfermedad y su agente etiológico.	1
1.1.2. Transmisión, sintomatología y patogénesis.	1
1.1.3. Importancia económica.	3
1.1.4. Distribución mundial. Situación en la Argentina y en la región.	4
1.1.5. Diagnóstico y control de la enfermedad.	6
1.2. El virus de la fiebre aftosa.	8
1.2.1. Estructura de la cápside.	8
1.2.2. Organización genómica.	10
1.2.2.1. La región 5' no codificante.	11
1.2.2.2. Región codificante.	13
1.2.2.3. Región 3' no codificante.	15
1.3. Ciclo de replicación.	15
1.3.1. Entrada a la célula.	16
1.3.2 Traducción y procesamiento proteolítico.	18
1.3.3 Replicación del ARN.	19
1.3.4. Encapsidación y maduración.	21
1.4. Diversidad del VFA.	21
1.4.1. Variabilidad genética.	22
1.4.2. Variabilidad antigénica y sitios antigénicos.	22

1.5. Respuesta inmune contra el virus de la fiebre aftosa.	23
1.6. Vacunación contra el VFA.	25
1.7. El uso de la genética reversa para estudios en virología.	26
1.7.1 Aplicación de técnicas de genética reversa en estudios en Picornavirus.	27
1.7.2 Estudios en el VFA.	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo general.	30
2.2. Objetivos específicos.	30
2.3. Hipótesis de trabajo.	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Virus, plásmidos y células utilizadas.	32
3.2. Diseño de primers.	32
3.3. Precipitación de ADN con Etanol.	32
3.4. Extracción de ARN con TRIzol.	33
3.5. Retrotranscripción con GoScript™ Reverse TranscriptionSystem (Promega)	33
3.6. Reacción de PCR con la enzima Pfx50.	33
3.7. Reacción de PCR con la enzima GoTaq Polimerasa (Promega).	34
3.8. Digestión con enzimas de restricción.	34
3.9. Electroforesis en geles de agarosa.	35
3.10. Extracción y purificación de ADN de geles de agarosa.	35
3.11. Tratamiento de ADN con fosfatasa alcalina (defosforilación de los extremos 5' fosfato).	35
3.12. Adición de adenosina terminal ("A-tailing")	35
3.13. Ligación de moléculas de ADN.	36
3.14. "Toothpick assay".	36
3.15 Bacterias y medios de cultivo.	37
3.16. Transformación de bacterias competentes.	37
3.17. Minipreparaciones de ADN.	37
3.18. Maxi-preparaciones de ADN con columna.	38
3.19. Secuenciación de ADN.	39
3.20. Purificación de ARN con el kit SV Total RNA IsolationSystem (Promega).	39
3.21. Electroforesis de ARN en condiciones desnaturizantes.	39

3.22. Transcripción in vitro con T7 polimerasa.	40
3.23. Células.	40
3.24. Transfección de células.	40
3.24.1. Transfecciones de ARN con DMRIE-C.	41
3.24.2. Transfección de ARN con Lipofectamina.	41
3.24.3. Transfección de ADN con Lipofectamina.	42
3.25. Mutagénesis dirigida.	42
3.26. Mutagénesis por “Overlap extensión” PCR (OE-PCR).	42
3.27. Cuantificación de ARN por PCR en tiempo real.	43
3.27.1. Puesta a punto de la reacción.	43
3.27.2. Normalización con el gen endógeno GAPDH.	52
3.28. Inmunofluorescencia indirecta.	52
3.29. Ensayos de actividad de luciferasa.	53
3.30. Modelado de proteínas.	55
4. RESULTADOS	56
4.1. Parte I Construcción de una copia del genoma completo de la cepa del VFA O1/Campos y clonado de la misma en un plásmido, río abajo del promotor de la polimerasa T7.	56
4.1.1. Diseño de la estrategia de construcción de la copia del genoma completo de la cepa de VFA O1/Campos.	56
4.1.2. Amplificación del genoma.	57
4.1.3. Diseño del ensamblado del genoma completo e inclusión del tracto de poli(C).	58
4.2. Obtención del genoma del VFA en 4 fragmentos de ADN doble cadena.	59
4.2.1. Amplificación del segmento S.	59
4.2.2. Amplificación del segmento segmento L1.	60
4.2.3. Amplificación del segmento segmento L2.	61
4.2.4. Amplificación del segmento L3.	62
4.2.5. Ensamblado del segmento L2-3.	63

4.2.6. Ensamblado del fragmento S-L1.	66
4.2.7. Subclonado de un sector acotado del fragmento S-L1 (S-L1a) para la inserción del tracto de poli(C) (fragmento S-L1a-pC).	69
4.2.8 Reconstrucción del fragmento S-L1 incluyendo el tracto de poliC (S-L1pC).	73
4.2.9. Ensamblado final de las mitades 3' y 5' de la copia genómica de VFAO1/Campos.	74
4.3. Análisis de la secuencia completa de la copia del genoma de O1/Campos.	77
4.4. Transfecciones con ADN plasmídico.	78
4.4.1. Cotransfección de células BHK21 con el ADN linearizado del plásmido pK-VFA/O/O más un vector que sobreexpresa la polimerasa T7.	78
4.4.2. Análisis de los resultados de la transfección.	80
4.4.3. Confirmación de la identidad de ARN viral recuperado.	81
4.5. Transfecciones con ARN genómico.	82
4.5.1. Transfección ARNs simil genómicos obtenidos por transcripcion in vitro de pK-VFA/O1/Cam y evaluación de su capacidad infectiva.	82
4.5.2. Detección de ARN genómico de cadena positiva.	83
4.5.3. Detección de ARN genómico de cadena negativa.	84
4.6. Re-secuenciación del clon completo.	87
4.6.1. Secuenciación por "primer walking".	87
4.6.2. Análisis de la nueva secuenciación.	89
4.7.1 Reemplazo de la zona del ADN que comprende la deleción G4120.	89
4.7.2 Secuenciación completa del clon modificado.	90
4.7.3 Análisis de la secuencia del clon modificado.	91
4.7.4 Transfección ARNs simil genómicos obtenidos del clon completo de VFA O1/Campos modificado y evaluación de su capacidad infectiva.	91
4.8. Re-análisis de la secuencia de pK-VFA/O1/Cam.	91
4.8.1. Zonas no codificantes.	92

4.8.1.1. Región 5' NC, fragmento S.	92
4.8.1.2. Región 5' NC, fragmento L.	95
4.8.1.3. Región de Pseudoknots.	95
4.8.1.4. Región IRES.	96
4.8.1.5. Región 3' NC.	97
4.8.2 Región codificante.	99
4.9. Modelado de proteínas.	102
4.9.1 Sustitución N46D en L ^{pro} .	103
4.9.2 Sustitución A111T en VP2.	105
4.9.3 Sustituciones en 3D ^{pol} .	109
4.9.3.1 Sustitución L85P en 3D ^{pol} .	109
4.9.3.2. Sustitución L460R en 3D ^{pol} .	111
4.10. Reversión de las mutaciones encontradas en pK-VFA/O1/Cam.	113
4.10.1. Reversión de la mutación N46D.	113
4.10.2 Transfección de células BHK-21 con ARN transcripto de pK-VFA/O1/Cam-LpN46.	115
4.10.3 Reversión de la mutación A110T.	115
4.10.4 Transfección de células BHK-21 con ARN símil genómico derivado de pK-VFA/O1/Cam-VP2A110.	118
4.10.5 Reversión de la mutación L459R.	118
4.10.6 Transfección de células BHK-21 con ARN símil genómico derivado de pK-VFA/O1/Cam-3DL459.	120
4.11. Parte II Construcción de un replicón con la copia del genoma completo de la cepa del VFA O1/Campos, sustituyendo las proteínas de la cápside por el gen reportero Luciferasa.	121
4.11.1. Clonado del fragmento genómico comprendido entre los sitios XbaI y XmaI en pBluescript.	121
4.11.2 Amplificación por PCR de la secuencia codificante de la Luciferasa y clonado de la	

misma en pBlue-InsVFA.	122
4.11.3. Transfección del replicón pK-VFA:Luc y evaluación de su capacidad replicativa por RT-PCR.	124
4.11.4 Verificación de la síntesis de proteínas del replicón pK-VFA:Luc por medio de inmunofluorescencia indirecta.	126
4.11.5. Evaluación de la actividad del gen reportero de pK-VFA:Luc.	128
4.12. Modificación del replicón pK-VFA:Luc.	129
4.12.1. Amplificación por PCR de los segmentos Lpro, Luc y P2 y fusión de los mismos por OE-PCR.	130
4.12.2. Clonado del segmento Lpro-Luc-P2 en el esqueleto de pK-VFA\O1\Cam.	132
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	133
5.1. Clon de genoma completo de la cepa O1/Campos.	134
5.2. Clon replicón con el gen reportero Luciferasa.	140
5.3. Conclusiones del trabajo.	142
6. ANEXOS	143
Anexo I. Listado de primers utilizados en el trabajo.	144
Anexo II. Mapa de plásmidos utilizados.	147
Anexo III. Número de acceso de secuencias utilizadas para alineamiento.	155
Anexo IV. Alineamiento de secuencias proteicas utilizadas para los modelados y resultados obtenidos del análisis con el programa QMEAN.	157
Anexo V. Estructura secundaria de la región IRES.	161
7. BIBLIOGRAFÍA	166

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.27.1. Matriz de <i>primers</i> para RT PCR tiempo real.	45
Tabla 4.3.1. Cambios detectados en la secuencia de aa.	78
Tabla 4.4.1. Protocolos de transfección de ADN con Lipofectamina.	79
Tabla 4.6.1. <i>Primers</i> utilizados para la secuenciación por <i>primer walking</i> del clon completo.	88
Tabla 4.7.1. <i>Primers</i> utilizados para la nueva secuenciación completa.	90
Tabla 4.8.1. Cambios de aa en la región codificante.	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Mapa del estatus oficial de fiebre aftosa en los países miembros de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE).	5
Figura 1.2.1. Diagrama esquemático de la cápside del VFA.	8
Figura 1.2.2. Representación de la estructura de la cápside de VFA y de sus intermediarios de ensamblaje.	10
Figura 1.2.3. Organización genómica del VFA y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral.	11
Figura 1.3. Representación esquemática del ciclo replicativo de picornavirus.	16
Figura 1.3.1. Representación de la estructura tridimensional de un protómero biológico del VFA, con el <i>loop</i> GH expuesto.	17
Figura 1.3.2. Representación esquemática de la acción de las proteasas en el procesamiento de la poliproteína del VFA.	19
Figura 3.27.1. Real-time PCR con una matriz de <i>primers</i> para la optimización de las condiciones con el sistema SYBR Green.	
(A) Gráfico de fluorescencia normalizada versus ciclos de amplificación.	46
(B) Curva de disociación.	47
Figura 3.27.2. Gráfico de fluorescencia normalizada versus número de ciclos para la curva estándar.	48
Figura 3.27.3. Análisis de los datos obtenidos de la curva estándar.	50
Figura 3.27.4. Curva de disociación.	51
RESULTADOS PARTE I	
Figura 4.1.1. Esquema general de la construcción.	57
Figura 4.1.2. Esquema de amplificación del genoma de la cepa O1/Campos en 4 segmentos.	58
Figura 4.2.1. Fragmentos genómicos amplificados por PCR.	60
Figura 4.2.2. Restricción con <i>SpeI</i> de amplificaciones del segmento S clonado en p-GEM-T.	60
	XII

Figura 4.2.3. Esquema del fragmento 5' de la construcción.	60
Figura 4.2.4. Segmento L1.	61
Figura 4.2.5. Segmento L2.	62
Figura 4.2.6. Segmento L3.	63
Figura 4.2.7. Esquema del subclonado de los segmentos L2 y L3 en el plásmido pBluescript SKII.	64
Figura 4.2.8. Subclonado del segmento -L3 en pBluescript SKII.	64
Figura 4.2.9. Unión de los segmentos L2 y L3.	65
Figura 4.2.10. Esquema del subclonado del segmento L2-3 en el plásmido pKF4.	65
Figura 4.2.11. Segmento L2-3.	65
Figura 4.2.12. Identificación de las colonias recombinantes del subclonado del segmento L2-3 en el plásmido pKF4.	66
Figura 4.2.13. Subclonado del segmento L1 en el plásmido pBluescript SKII.	67
Figura 4.2.14. Esquema del ensamblado de los segmento S y L1 en el plásmido pBluescript SKII.	68
Figura 4.2.15. Segmento S-L1.	69
Figura 4.2.16. Esquema del subclonado del segmento SL1a en el plásmido pKF4.	70
Figura 4.2.17. Subclonado del fragmento S-L1a en el plásmido pKF4.	70
Figura 4.2.18. Esquema de la zona de unión entre los segmentos S y L1.	71
Figura 4.2.19. Incorporación del tracto de poli(C).	72
Figura 4.2.20. Secuenciación del tracto poli(C).	73
Figura 4.2.21. Diagrama explicativo de la reconstrucción del segmento SL1 incluyendo el tracto de poli(C).	74
Figura 4.2.22. Reconstrucción del fragmento S-L1 incluyendo el tracto de poli(C).	74
Figura 4.2.23. Esquema del ensamblado de las dos mitades del clon.	75
Figura 4.2.24. Cultivos bacterianos.	75
Figura 4.2.25. Ensamblado final del clon completo.	76

Figura 4.3.1 Diagrama del solapamiento de las secuencias del clon para la reconstrucción de la secuencia completa.	77
Figura 4.4.1. RT-PCR del ARN extraído post transfección del clon completo de la cepa O1/Campos (pK-VFA/O/P1).	80
Figura 4.4.2. Alineamiento de las secuencias de pK-VFA/O1/Cam, el amplicón del recuperado del P1 en células (VFA/O/P1) y de la cepa O1/Campos.	81
Figura 4.5.1. Integridad del ARN transcrito de pK-VFA/O1/Cam.	83
Figura 4.5.2. RT-PCR del ARN extraído post transfección con ARN transcrito de pK-VFA/O/P1.	84
Figura 4.5.3. Detección de la hebra negativa de ARN.	85
Figura 4.5.4. Real time PCR de la muestras de los 2 primeros pasajes post transfección con ARN transcrito de pK-VFA/O1/Cam.	86
Figura 4.5.5. RT-PCR de la transfección con ARN transcrito de pK-VFA/O1/Cam, y los dos primeros repiques de células sin lisar.	87
Figura 4.6.1. Esquema de la secuenciación por <i>primer walking</i> .	88
Figura 4.6.2. Alineamiento de secuencias parciales obtenidas por <i>primer walking</i> con la de la cepa O1/Campos.	89
Figura 4.7.1. Diagrama del solapamiento de las secuencias del clon para la reconstrucción de la secuencia completa.	90
Figura 4.8.1A-B Estructura secundaria del segmento S de la región 5' NC.	93
Figura 4.8.1C-D. Estructura secundaria del segmento S de la región 5' NC (continuación).	94
Figura 4.8.2 Secuencia del fragmento S de pK-VFA/O1/Cam.	94
Figura 4.8.3 Alineamiento de las secuencia de la zona del IRES de pK-VFA/O1/Cam con la secuencia consenso.	96
Figura 4.8.4 Estructura secundaria del IRES donde se identifica la posición de las mutaciones encontradas en pK-VFA/O1/Cam.	97

Figura 4.8.5. Alineamiento de las secuencia 3' NC de pK-VFA/O1/Cam con la secuencia consenso.	98
Figura 4.8.6 Estructura secundaria de las zonas 3' NC.	99
Figura 4.8.7 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del clon, de VFA O1/Campos y de la secuencia consenso de Carrillo y cols. (2005).	101
Figura 4.9.1. Modelado de L ^{pro} .	104
Figura 4.9.2. Sitio activo de L ^{pro} .	105
Figura 4.9.3. Modelado de la proteína VP2.	106
Figura 4.9.4. Detalle de la estructura en la posición 111 de VP2.	107
Figura 4.9.5. Entorno de la cadena lateral de la sustitución A111T.	108
Figura 4.9.6. Modelado de 3D ^{pol} .	110
Figura 4.9.7. Detalle en la posición 85 de las estructuras superpuestas de la proteína 3D de VFA C-S8c1 y de la molécula modelada.	110
Figura 4.9.8. Orientación espacial de las cadenas laterales de L85 y P85.	111
Figura 4.9.9. Orientación espacial de las cadenas laterales de L460 y R460.	112
Figura 4.9.10. Alineamiento de los extremos carboxilo-terminal de las proteínas 3D de VFA y Poliovirus.	113
Figura 4.10.1. Esquema del método utilizado para revertir la mutación N46D.	114
Figura 4.10.2. Restricción de pGL1-N46D y screening de pK-VFA/O1/Cam-LpN4.	115
Figura 4.10.3. Esquemas de OE-PCR y clonado.	117
Figura 4.10.4. OE-PCR.	117
Figura 4.10.5. <i>Screening</i> de de pK-VFA/O1/Cam-VP2A111.	118
Figura 4.10.6 Esquema de la construcción del revertante de L460R.	119
Figura 4.10.7. Duplicación de secuencia en pSFI-L3-L460.	119
Figura 4.10.8. Restricciones de pSFI-L3-L460 y pK-VFA/O1/Cam.	120
RESULTADOS PARTE II	
Figura 4.11.1. Esquema de la construcción del replicón.	122

Figura 4.11.2 Clonado del segmento XbaI-XmaI en pBluescript SKII.	122
Figura 4.11.3. Clonado de Luc en pBlue-InsVFA.	123
Figura 4.11.4. Alineamientos de las secuencias aminoacídicas de VFA O1/Campos, pBlue-InsVFA:Luc y Luc.	123
Figura 4.11.5. Clonado del fragmento AflII-XmaI de pBlue-InsVFA:Luc en el esqueleto de pK-VFA/O1/Cam y <i>screening</i> .	124
Figura 4.11.6. Transcripción in vitro del replicón pK-VFA:Luc.	125
Figura 4.11.7. RT-PCR de la hebra negativa de VFA:Luc.	126
Figura 4.11.8. Detección del replicón pK-VFA:Luc por Inmunofluorescencia.	127
Figura 4.11.9 Ensayo de actividad del Luciferasa.	129
Figura 4.12.1. Esquema de la modificación del replicón.	130
Figura 4.12.2. Amplicones de L ^{pro} , Luc, P2 y OE-PCR entre los amplicones L ^{pro} y Luc.	131
Figura 4.12.3. Fragmento L ^{pro} -Luc-P2.	131
Figura 4.12.4. Alineamiento de las secuencias de aa de VFA O1/Campos, pK-VFA:Luc' y Luc.	132
DISCUSIÓN	
Figura 5.1. Esquema de la construcción final de pK-VFA/O1/Cam.	135
Figura 5.2.: Esquema de los dos replicones generados a partir de pK-VFA/O1/Cam.	141

ABREVIATURAS, SIGLAS Y TÉRMINOS UTILIZADOS

aa: Aminoácido.

Ac: Anticuerpo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

Amp: Ampicilina.

Antisense: *primer* reverso.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido Ribonucleico mensajero.

BAC: Bácmido.

Background: Trásfondo.

BHK-21: Fibroblastos adherentes obtenidos de riñón de hámster lactante.

Buffer: Solución tamponada (mantiene constante su pH).

BSA: seroalbúmina bovina.

°C: grados centígrados.

Cap: 7-metilguanósina unida covalentemente al extremo 5' del ARNm.

cm²: Centímetro cuadrado.

CO₂: Dióxido de carbono.

cols.: Colaboradores.

Ct: *Cycle threshold* (Ciclo umbral).

DMEM: Medio esencial mínimo de Dulbecco.

dNTPs: Deoxinucleótidos.

DO: Densidad óptica.

dpi: Días post infección.

ECP: Efecto citopático.

EDTA: Ácido etilendiamidotetraacético.

etc: Etcétera.

Fig.: Figura.

Fitness: Eficacia biológica.

Full-length: De tamaño completo.

g: gramo.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

G-MEM: Medio Esencial Mínimo Glasgow.

h: Hora.

hs: Horas.

HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico.

Hotspots: Sitios con alta tasa de mutación o recombinación.

hpi: Horas post infección.

hpt: Horas post transfección.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

Ig: Inmunoglobulina.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

IPTG: Isopropil-Beta-D-Tiogalactopiranosido.

IRES: Sigla en inglés para "sitio interno de unión a los ribosomas".

Kan: Kanamicina.

Kb: Kilo base.

kDa: Kilo Daltons.

l: Litro.

LB: Luria-Bertani, medio rico nutricional utilizado para el crecimiento de bacterias.

Log: Logaritmo en base 10.

Loop: Estructura secundaria del ARN en forma de bucle.

M: Molar.

mAb: Anticuerpo monoclonal.

μl: Microlitro.

μg Microgramo.

mg: Miligramo.

ml: Mililitro.

mM: Milimolar.

min: Minuto.

MOI: Multiplicidad de infección.

N: Normal.

NC: No codificante.

ng: Nanogramo.

nm: Nanómetro.

nt: Nucleótidos.

ON: *OverNight*.

pA: Tracto de poliadeninas.

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida.

PANAFTOSA: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

pb: Pares de bases.

PBS: Phosphate buffered saline: solución salina de fosfatos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PEG: Polietilenglicol.

Pellet: Precipitado obtenido de la centrifugación.

pH: Potencial hidrógeno.

PM: Peso molecular.

pmol: Picomoles.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

primers: Cebadores, u oligonucleótidos iniciadores.

rev: *Reverse primer*.

rpm: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: Retro Transcripción seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

SD: Desvío estándar.

SDS: Dodecyl sulfato de sodio. Detergente aniónico.

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal.

Sense: *Primer forward* (cebador de sentido directo).

SFB: Suero Fetal Bovino.

Stem-loop: Estructura secundaria del ARN en forma de tallo y bucle.

T7: Bacteriofago T7.

T7 pol: ARN Polimerasa ADN dependiente del Bacteriofago T7.

TA: Temperatura Ambiente.

Taq Pol: ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*.

UTR: Región no codificante (*UnTranslated Region*).

UFP: Unidades formadoras de placas.

UV: Luz Ultravioleta.

VFA: Virus de la fiebre aftosa.

VP: Proteínas estructurales de VFA ("VP1", "VP2", "VP3" y "VP4").

WB: Western Blot.

WT: de Tipo Salvaje.

%: Porcentaje.

Background: Trasfondo.

CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS DE LOS AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Ácido aspártico	Asp	D
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

Diseño de un sistema de genética reversa del virus de la fiebre aftosa

Adrián Nicolás Giraldez

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Fiebre Aftosa.

1.1.1. La enfermedad y su agente etiológico.

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad que afecta a animales rumiantes biungulados (*artiodáctilos*), destacándose aquellos de los principales sectores ganaderos, como bovinos, porcinos, ovinos y caprinos, aunque esta lista se podría extender a más de 70 especies diferentes susceptibles a la infección natural o experimental (Pereira, 1981; Casas Olascoaga, y cols., 1999; Mahy, 2005)

Los primeros registros que existen de esta enfermedad datan del siglo XVI, y fueron realizados por el humanista italiano Girolamo Fracastorius, en 1546. Tres siglos más tarde la FA fue la primera enfermedad animal asociada a un elemento filtrable (Loeffler y Frosch 1898), el que fue posteriormente denominado Virus de la Fiebre Aftosa (VFA).

Es una enfermedad vesicular aguda, altamente contagiosa e inmunológicamente compleja, de diseminación muy rápida, y la que causa más pérdidas económicas en la ganadería (revisado en Casas Olascoaga y cols., 1999; Sobrino y Domingo, 2004; Mahy, 2005).

Su agente causal es un virus de genoma a ARN el cual, de forma semejante a lo que ocurre con otros virus a ARN, presenta un alto polimorfismo genético y antigénico (Bachrach 1968, Pereira, 1977; Domingo y cols., 1980; Domingo y Holland, 1992), verificándose la existencia de siete serotipos con características serológicas diferentes: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia. Debido a estas diferencias, los animales recuperados de la infección o vacunados contra un serotipo viral, son susceptibles a la infección por cepas de otros serotipos, o inclusive por algunas variantes dentro del mismo serotipo (Bachrach, 1968; Brooksby, 1982; Cartwright y cols., 1982).

1.1.2. Transmisión, sintomatología y patogénesis.

Aunque se han descrito varias rutas de entrada del virus, la principal vía de infección natural por el VFA es la vía respiratoria (Brooksby, 1982).

El virus se transmite por contacto directo a través de saliva, leche y semen, (Hyslop, 1965; Cottral y cols., 1968; Sellers, 1971), o en forma indirecta por transporte mecánico en sustancias contaminadas, tales como restos de animales, equipos agrícolas, personas, ropa, etc. (Cottral y cols., 1960). También se ha descrito que puede ser transportado por el viento a grandes distancias (Ferguson y cols., 2001). La penetración del virus en el animal hospedador

se da a través de los epitelios de la boca, nariz o laringe, donde ocurre rápidamente la replicación viral, que produce vesículas o aftas primarias en el morro, lengua y paladar. Luego de 3 o 4 días la infección se generaliza, produciéndose el período de viremia febril (40-41 °C), en el cual el virus alcanza los epitelios alejados del punto de entrada, como el espacio interdigital en las patas, y los pezones donde produce aftas secundarias (Schudel, 1986). Posteriormente, las vesículas aumentan de tamaño y se rompen, produciendo la sintomatología clásica de salivación abundante, reducción de la movilidad; dificultad de alimentación, ordeño y lactancia (Shahan, 1962) y otros síntomas característicos como diarrea y debilidad muscular, que llevan a una importante pérdida de peso y consecuentemente de producción. Durante el período de viremia es posible detectar altos niveles de virus en todas las secreciones, en los aerosoles respiratorios, en sangre, órganos y tejidos (Burrows, 1968).

La severidad de los síntomas clínicos es variable en las diferentes especies hospedadoras, observándose una sintomatología más severa en cerdos, y más leve en ovinos y caprinos, en los que puede incluso pasar inadvertida (Hughes y cols., 2002; Mahy, 2005).

A pesar de su alta morbilidad, la FA presenta un bajo índice de mortalidad (Pereira, 1981), no superando el 5% en animales adultos; aunque puede llegar hasta valores de 50% en animales muy jóvenes afectados de miocarditis asociada al VFA (Timoney J. F., 1988)

Tras la fase aguda de la enfermedad, que puede durar entre dos y tres semanas, en algunos animales se establece una infección persistente, en la cual el virus se mantiene replicando en el tracto orofaríngeo (Van Bekkum y cols., 1959) durante largos periodos de tiempo. El mecanismo que lleva al establecimiento de la infección persistente no se conoce, aunque se ha postulado que podría ser debido al establecimiento de un equilibrio dinámico entre la respuesta inmunológica del animal y la selección de variantes virales en la mucosa del tracto respiratorio superior (Salt, 1993). El estado de infección persistente se ha observado inclusive en animales vacunados (Sutmöller y Gaggero, 1965; Augé de Mello, Honigman y Fernandes, 1970; Sutmöller Mc Vicar y Cottral, 1968; Hedger, 1970), lo cual es relevante para los programas de control y erradicación. Se ha descrito la recuperación de virus a partir de la zona orofaríngea de animales persistentemente infectados hasta 30 meses luego de la infección en los bovinos, o más tiempo en el búfalo y hasta 9 meses en los ovinos (Gebauer y cols., 1988; Dawe y cols., 1994; Malirat y cols., 1994; Salt J.S., 2004, Barros, y cols., 2006). En cerdos, el estado de portador asintomático no se ha podido demostrar fehacientemente. Si bien no se ha podido demostrar transmisión a partir de animales persistentemente infectados en condiciones de campo, hay preocupación en la comunidad internacional de que la vacunación sistemática pueda enmascarar la circulación viral (Bergmann, Malirat y Falczuk,

2005). El establecimiento de infecciones persistentes del VFA en células BHK-21 también fue descrito (de la Torre y cols., 1985). El mecanismo por el cual se establece esta infección persistente implica una co-evolución de las células, que se hacen progresivamente más resistentes a la infección por el VFA, y del virus, que incrementa su virulencia sobre las células infectadas (Toja y cols., 1999; Herrera y cols., 2008).

1.1.3. Importancia económica.

Como se ha mencionado anteriormente, la FA es una de las enfermedades animales que más negativamente impactan la economía a nivel mundial. Existen varias razones para ello, que se presentan tanto a nivel local como nacional, y pueden ser consideradas como pérdidas directas o indirectas. Las pérdidas directas se concentran en la reducción en la producción de carne y pérdidas de hasta un 25% en la producción láctea anual del ganado lechero. Se ha reportado hasta un 20% de tiempo extra necesario para alcanzar la madurez en bovinos y una reducción del 20% en la producción anual de carne porcina. Los costos por el descarte de animales improductivos, interrupción de las actividades, necesidad en algunos casos a recurrir a la importación de animales o sus productos, pérdida de stock genético e interrupción de programas de mejoramiento genético también deben ser contabilizados. Las pérdidas indirectas incluyen los costos del control y erradicación de la enfermedad, tales como compensación a los ganaderos, salarios a veterinarios y personal operacional y de soporte, interrupción de negocios en general, restricciones que afectan al movimiento de personas y al turismo (Huang y cols., 2000; Correa Melo y cols., 2002).

El costo de este impacto económico negativo, puede llegar a valores exorbitantes, como ocurrió luego del brote de FA tipo O en Gran Bretaña en el año 2001, que supuso pérdidas de más de 6 mil millones de libras esterlinas (Thompson y cols., 2002). Se han descrito graves consecuencias luego de la aparición de esta enfermedad en áreas que eran libres (Cottam y cols., 2008; Li y cols., 2008), como el caso del brote de tipo O en Taiwán en el año 1997, cuando se sacrificaron 4 millones de cerdos, con un costo aproximado para su economía de 6.000 millones de dólares (Kitching, 1998). En nuestra región, la epidemia del virus tipo A en el año 2001 fue devastadora (Sutmoller y cols., 2003; Mattion y cols., 2004), y nuestro país contabilizó pérdidas que, solamente en concepto de interrupción de exportaciones, alcanzó los 400 millones de dólares (Amador, 2004).

1.1.4. Distribución mundial. Situación en la Argentina y en la región.

La FA es una enfermedad conocida desde hace ya varios siglos, y posee una distribución prácticamente mundial (Mahy, 2005), habiéndose registrado episodios de FA en casi todas las regiones ganaderas del mundo.

Los estudios de epidemiología molecular sugieren que Europa habría actuado como el eje central de la enfermedad desde donde se extendió al resto del mundo, produciéndose dos grandes radiaciones a finales del siglo XVII y principios del XVIII que dieron lugar a las actuales cepas circulantes Euroasiáticas y Sudafricanas (Sobrino y cols., 2001; Tully y Fares, 2008).

La FA llegó a estar muy extendida en el pasado; aunque en la actualidad, y tras la aplicación de fuertes campañas de erradicación y control, se ha conseguido su erradicación en diversas zonas del planeta, y hoy se considera que la enfermedad solamente se mantiene endémica en la mayoría de los países de Asia y África. En América del Sur solamente son endémicos Ecuador y Venezuela, y existen zonas en Bolivia y la Amazonia, donde el estatus de la enfermedad no está claramente definido (Fig. 1.1).

La proximidad geográfica y la existencia de intercambios comerciales con países en los que la FA es endémica, impone un riesgo permanente de reintroducción en los países libres. De hecho, en los últimos años se han registrado numerosos brotes de en países que se consideraban libres de la enfermedad, como es el caso de Taiwán (Dunn y Donaldson, 1997), en países de Europa, como Grecia, Rusia, y los Balcanes, (Valarcher y cols., 2008), en Japón (Sakamoto y Yoshida, 2002), en el Reino Unido (Samuel y Knowles, 2001) y en regiones ya declaradas libres de América del Sur (Konig y cols., 2007; Mattion y cols., 2004; Malirat y cols., 2007; Maradei y cols., 2013). La información detallada y actualizada sobre la situación actual de la FA se registra periódicamente en la página web de la Organización Mundial de Salud Animal (<http://www.oie.int>).

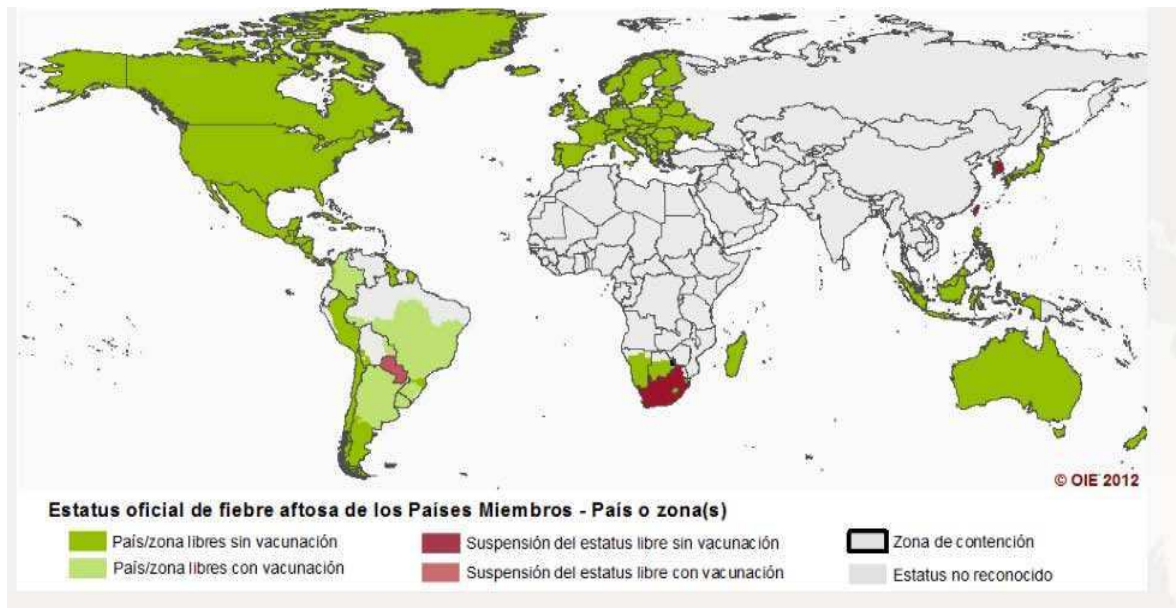


Figura 1.1. Mapa del estatus oficial de fiebre aftosa en los países miembros de la Organización

Mundial de Salud Animal (OIE). Actualización al 17 de Octubre de 2012. [www: http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/fiebre-aftosa/es-fmd-carte/](http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/fiebre-aftosa/es-fmd-carte/)

Los siete serotipos del VFA no han aparecido distribuidos uniformemente alrededor del mundo: los serotipos SAT 1, 2 y 3 se han restringido casi exclusivamente a la zona del Sub-Sahara en África; los serotipos O, A y C han tenido una más amplia distribución en varias zonas de Europa, África, Asia y América del Sur, (normalmente el C con una menor dispersión) y el serotipo Asia 1 normalmente sólo se presenta en Asia (Knowles y Samuel, 2003).

En relación al continente Americano, la enfermedad fue registrada desde el final del siglo XIX y hasta mediados del siglo XX en la mayoría de sus países. En América del Norte y tras el empleo principalmente del rifle sanitario, los últimos brotes de FA registrados ocurrieron en 1929 en EEUU en 1929, en 1952 en Canadá y en 1953 en Méjico. En América del Sur, y a partir de la implementación del Plan Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa en el año 1988, y el fortalecimiento de los planes nacionales, se han alcanzado logros importantes en la creación de áreas y países libres de FA (Correa Melo, Saraiva y Astudillo, 2002). En la actualidad solo dos países, Ecuador y Venezuela, presentan FA en forma endémica, siendo que el resto ha sido declarado por la OIE como libres de FA con o sin vacunación, ya sea en la totalidad o en áreas específicas de sus territorios, a pesar de que se ha registrado esporádicamente la re-aparición de brotes en algunas de estas zonas/países, como los registrados con el virus serotipo O en el Cono Sur: Argentina, en los años 2000 y 2006, Brasil en los años 2000 y 2005, Bolivia en los años 2003 y 2007, Paraguay en los años 2002 y 2011 y 2012 y Uruguay en el año 2000 (Malirat y cols., 2007 y Maradei y cols., 2013). En el área

andina, Colombia ha sufrido re-introducciones de VFA tipo O y A en el año 2008 y de tipo O en el 2009 (Malirat y cols., 2011 y 2012).

En el caso particular de nuestro país, la Argentina fue declarada como libre sin vacunación en el año 2000 por la OIE, pero la aparición de brotes aislados posteriormente ese mismo año de tipo O y A, y de la gran epizootia con virus serotipo A en el año 2001, que se difundió rápidamente a Uruguay y en parte a Brasil, llevó a las autoridades del país a restablecer la obligatoriedad de vacunación en la zona al norte del paralelo 42º, como medida profiláctica para evitar nuevas re-introducciones (Mattion y cols., 2004; König y cols., 2007). Lograda la eliminación de la epidemia de virus A, en el año 2002, el estatus de libre con vacunación fue otorgado por la OIE al territorio al norte del paralelo 42º, al año siguiente, y suspendido provisoriamente por un período de 11 meses, en ocasión del episodio de serotipo O en el año 2006. La zona al sur de este paralelo es reconocida por la OIE como zona libre sin vacunación.

1.1.5. Diagnóstico y control de la enfermedad.

La FA figura en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE. El diagnóstico de la enfermedad se basa inicialmente en el reconocimiento de los signos clínicos característicos, pero debido a que otras enfermedades vesiculares (entre otras la estomatitis vesicular, la enfermedad vesicular del cerdo, el exantema porcino, la diarrea viral bovina) también originan signos clínicos similares a los de la FA, se requiere de la confirmación del diagnóstico mediante pruebas de laboratorio (Casas Olascoaga y cols., 1999; Grubman y Baxt, 2004).

Esta confirmación se realiza preferentemente mediante el aislamiento en cultivo de células a partir de un animal infectado y la posterior identificación del VFA. La identificación se basa en la detección de antígenos (mediante técnicas de ELISA o Virus Neutralización) o del ácido nucleico viral (por RT-PCR o RT-PCR en tiempo Real). La detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales (PNE), que solo intervienen en la replicación, puede ser utilizada siempre y cuando estos sean detectados en animales que hayan manifestado signos clínicos compatibles con la enfermedad, y estén epidemiológicamente relacionados con una sospecha o un brote confirmado de fiebre aftosa (OIE, 2012). Una vez que se ha confirmado la presencia del VFA, es deseable que el diagnóstico se complete con una caracterización más profunda del agente en cuestión, que incluya estudios de tipificación por fijación del complemento, parentescos genéticos mediante análisis de la secuencia de nucleótidos de la proteína VP1 y antigénicos mediante ELISA utilizando anticuerpos monoclonales o por virus neutralización, y en los casos en que se utiliza la vacunación como medida de control, un análisis de la potencial

protección heteróloga de la cepa actuante por las vacunas o antígenos vacunales disponibles, para lo cual pueden realizarse pruebas *in vitro*, como relaciones de parentesco en base a títulos de anticuerpos neutralizantes o medidos por ELISA y pruebas *in vivo* como la protección de animales vacunados al desafío con la cepa circulante (Goris y cols., 2008; Mattion y cols., 2009; Robiolo y cols., 2010; Maradei y cols., 2011 y 2013).

Adicionalmente a la comunicación inmediata a la OIE, los países que sufren una reintroducción de la enfermedad, deben cumplir con ciertos requisitos para poder solicitar rápidamente la restitución de su estatus. Estas medidas adicionales que se detallan en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE (OIE, 2012), incluyen: (a) la demostración de que se cuenta con un sistema de detección y alerta temprano; (b) la adopción de las medidas de contención y prevención apropiadas; (c) la comprobación fehaciente de que, una vez controlado el brote, no existe actividad viral remanente. Esta comprobación se lleva a cabo mediante estudios de laboratorio, por ejemplo la evaluación de ausencia de anticuerpos contra proteínas que intervienen en la replicación viral en sueros colectados con un diseño adecuado (Bergmann y cols., 2005, Brocchi y cols., 2006).

Las estrategias de contención, control y erradicación aplicadas por los países contra la FA dependen en mayor o menor medida de su estatus sanitario. En zonas o países libres de la enfermedad se basan en la aplicación de un estricto control de la importación de rumiantes y productos, el mantenimiento de un fuerte sistema de vigilancia epidemiológica en todo el territorio, y en el fortalecimiento de los programas de Sanidad Animal, incluidos los laboratorios de diagnóstico y control de vacunas. Las medidas de emergencia para controlar un brote incluyen restricciones en el movimiento de hacienda, la vacunación en anillo, y el eventual sacrificio de los animales, o "rifle sanitario". El sacrificio masivo de animales en el caso de reintroducción de la enfermedad, como la ocurrida en el Reino Unido en 2001 (revisado en Sobrino y Domingo, 2004), ha levantado una fuerte controversia sobre la conveniencia o no de la vacunación de los animales susceptibles en situaciones de emergencia. Las vacunas actualmente usadas son preparadas mediante la inactivación química con BEI de virus crecido en cultivos celulares (Bahnemann, 1975). Para la formulación de las vacunas se utiliza principalmente adjuvante oleoso o alternativamente hidróxido de aluminio (Augé de Mello y cols., 1977; Augé de Mello, 1982). Como no existe protección cruzada entre los distintos serotipos, y solamente es parcial entre los subtipos de un mismo serotipo (Brooksby, 1982), la selección de las cepas para vacunas apropiadas a cada situación es un elemento importante para el control de la FA (Mattion y cols., 2004; Maradei y cols., 2011).

1.2. El virus de la fiebre aftosa.

El VFA está clasificado actualmente por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus dentro del orden Picornvirales en la familia Picornaviridae (Mahy, 2005), y constituye la especie tipo dentro del género Aphthovirus (Fauquet y cols., 2005), dentro del cual también se describen el virus de la rinitis equina-A (VRE-A) (Li y cols., 1996) y el virus de la rinitis bovina-2 (VRB-2) (Hollister y cols., 2008). Es un virus de genoma ARN de cadena simple y polaridad positiva. El virión intacto presenta un peso molecular de $8,4 \times 10^6$ Da (Strohmaier and Adam, 1976), y un coeficiente de sedimentación de 140S y su densidad en cloruro de cesio es de (1,43-1,45 g/cm³). Las cápsides de VFA son extremadamente sensibles a las altas temperaturas y, a diferencia de lo que ocurre con otros picornavirus, también al pH ácido (Brown, 1972; Newman y cols., 1973).

1.2.1. Estructura de la cápside.

El VFA es un virus pequeño y como todos los Picornavirus carece de envoltura lipídica. La partícula viral está compuesta por ácido ribonucleico en un 30% y por proteína en un 70% (Burness y cols., 1973; Drzeniek and Bilello, 1974). Su cápside, de simetría icosaédrica 5:3:2 y de 27 a 28 nm de diámetro en la partícula seca (Wild y cols., 1969; Acharya y cols., 1989), está compuesta por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 (Fig. 1.2.1; adaptado de Racaniello, 2007).

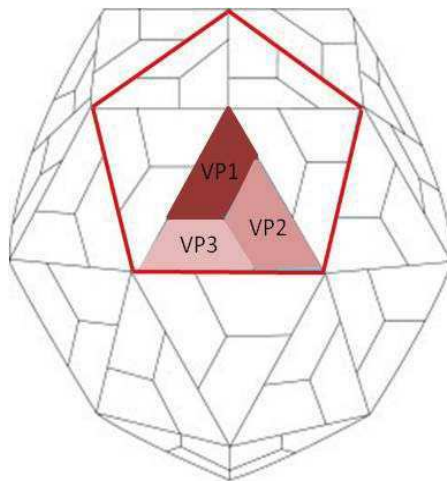


Figura 1.2.1. Diagrama esquemático de la cápside del VFA. Las cuatro proteínas estructurales, VP1-4, forman la menor subunidad de la cápside, el protómero. Cinco protómeros se unen para formar un pentámero, y 12 pentámeros constituyen la cápside completa. La proteína VP4 está localizada en la cara interna, por lo cual no se visualiza en la representación.

La estructura tridimensional, resuelta mediante cristalografía de rayos X a nivel atómico, muestra una gran similitud conformacional entre los serotipos para los cuales se dispone de

estas estructuras: O (Achayra y cols., 1989), C (Lea y cols., 1994) y A (Curry y cols., 1996). Las proteínas VP1, VP2 y VP3, con de algo más de 200 aminoácidos cada una y peso molecular entre 27 y 30 kDa, comparten una estructura terciaria similar en forma de barril β , compuesta por ocho cadenas β antiparalelas conectadas entre sí por “*loops*” de longitud variable (Hogle y cols., 1985). La proteína VP4, formada por 85 residuos y de 10 kDa aproximadamente, adopta una estructura extendida en la superficie interior de la cápside (Boothroyd y cols., 1982; Curry y cols., 1997) y se encuentra unida covalentemente a un residuo de ácido mirístico en su extremo N-terminal (Belsham y cols., 1991). En su interior la cápside aloja dos copias de la polimerasa viral (codificada por el gen 3D) de 52 kDa (Newman y cols., 1994), y también se ha descrito la presencia de otras proteínas que participan del complejo de replicación, como 2C, 3C, 3CD (Newman y Brown, 1997). La protrusión de los *loops* y de partes de las cadenas β permite su interacción con anticuerpos (revisiones en Mateu, 1995; Mateu y Verdaguer, 2004).

Una molécula de cada una de las proteínas de la cápside, VP1, VP3 y el precursor de VP4+VP2 (VP0) constituyen un protómero biológico, que presenta un coeficiente de sedimentación de 5S. Cinco protómeros se asocian formando un pentámero, de coeficiente de sedimentación 12S, y doce pentámeros se unen para formar la cápside, de coeficiente de sedimentación 140S (Fig. 1.2.2). La encapsidación del ARN ocurre tras el ensamblaje de los protómeros en pentámeros, y de los pentámeros entre sí, y esto desencadena un proceso autoproteolítico en el precursor VP0 que se cliva generando VP4 y VP2 maduras (Knipe y cols., 1997), lo cual es imprescindible para la infección (Curry y cols., 1997).

En cada eje de simetría quíntuple se localiza un poro hidrofóbico, en cuya base se encuentran los extremos N-terminales de las cinco copias de VP4. Los pentámeros se relacionan entre sí mediante su asociación alrededor de los ejes de simetría terciaria a los que rodean tres copias de VP2 y VP3 correspondientes a pentámeros distintos. (Mateo y cols., 2003), y también se han descrito puentes disulfuro entre subunidades de un mismo pentámero, que están situados cerca de los ejes quíntuplos de su cápside y que podría estar contribuyendo a la estabilidad del virión en ciertas condiciones (Diez y cols., 1990).

En ciertas circunstancias es posible detectar partículas que presentan un coeficiente de sedimentación de 75S, las cuales se reconocen como cápsides vacías, y son productos naturalmente defectivos que contienen moléculas de VP1, VP3 y el precursor VP0, pero no contienen ARN viral.

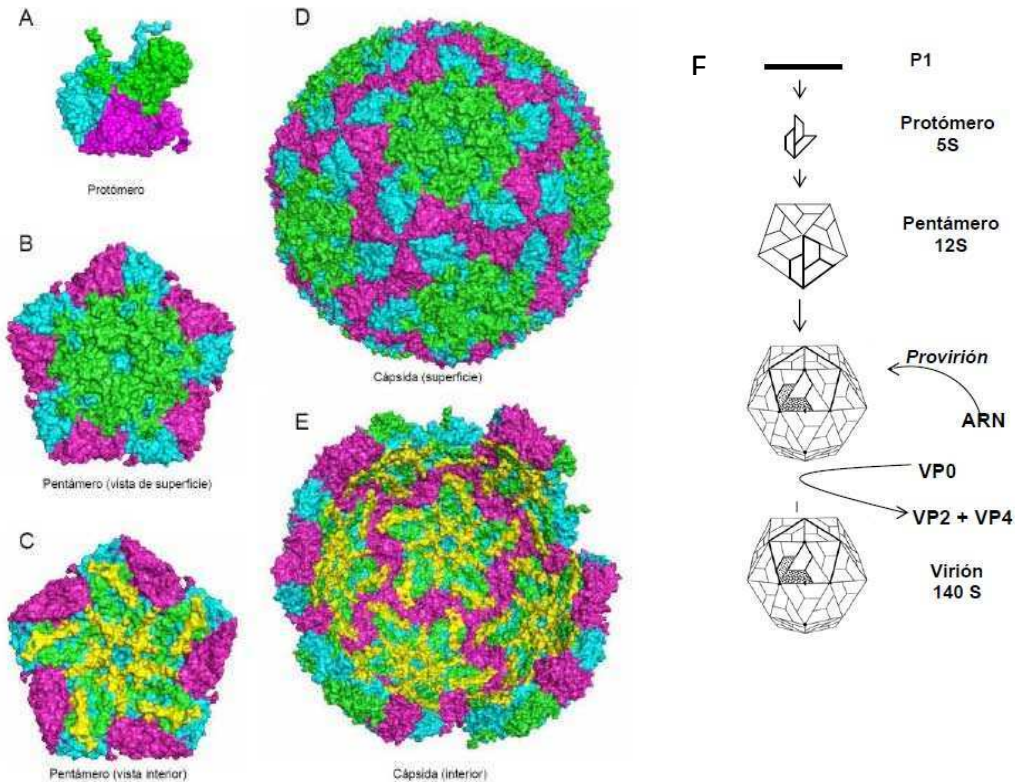


Figura 1.2.2. Representación de la estructura de la cápside de VFA y de sus intermediarios de ensamblaje.

VP1: verde, VP2: violeta, VP3: celeste y VP4: amarillo. A) Superficie del protómero biológico (5S); B) Superficie externa de una subunidad pentamérica (12S); C) Cara interna de una subunidad pentamérica; D) Cápside completa. (140S); E) Cara interna de la cápside completa. F) Ruta de ensamblaje (ver texto para explicación más detallada). (Adaptado de Martín-Acebes, 2009).

1.2.2. Organización genómica.

Dentro de la estructura formada por la cápside se encuentra el genoma viral, una molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva, de aproximadamente 8,4 Kb (Bachrach, 1977), con un peso molecular de 2700 kDa y un coeficiente de sedimentación de 35S (La Torre, 1980). La estructura de esta molécula se muestra en la Fig. 1.2.3. El genoma viral está flanqueado en ambos extremos por regiones no codificantes (5' y 3' UTRs, por "Un Translated Regions"), que incluyen elementos reguladores con complejas estructuras secundarias y terciarias (Belsham y Martínez-Salas, 2004; Carrillo y cols., 2005; Flint y cols., 2009). Entre estas dos regiones se localiza la región codificante, con una única fase de lectura abierta (ORF). En el extremo 3' se observa un tracto poliadenílico o poli(A) (Chatterjee y cols., 1976; Sangar y cols., 1977), que puede variar en longitud entre 20 y 200 bases (Porter y cols., 1978). Su extremo 5' se encuentra covalentemente unido a una proteína viral, VPg (*virion protein genome*), la cual juega un rol importante en la iniciación de la síntesis del ARN viral.

papel en la regulación entre traducción y replicación (Escarmís y cols., 1992; Witwer y cols., 2001) y en interacciones ARN/ARN con el extremo 3' (Serrano y cols., 2006).

Tracto de poli(C): región de longitud variable (Costa Giomi, y cols., 1984), presente también en cardiovirus pero no en otros picornavirus. El significado biológico de su longitud no está muy claro, pues ha sido estudiado en diferentes ocasiones asociado con la virulencia (Zibert y cols., 1990, de la Torre y cols., 1988; Diez y cols., 1990; Rieder y cols., 1993, Escarmís y cols., 1998), tanto en cultivo de células, como en animales susceptibles, aunque con resultados contradictorios.

Pseudonudos: comprendidos en una región de aproximadamente 250 nt adyacentes al poli(C), se localizan de 2 a 4 estructuras terciarias repetidas denominadas pseudonudos ("pseudoknots"=PKs) (Pleij, 1990; Escarmís y cols., 1995), cuya funcionalidad se desconoce, pero podrían estar implicadas en el mantenimiento conformacional del extremo 5' no codificante, y se ha sugerido podrían tener una actuación ligada a la del tracto de poli(C) (Martin y Palmenberg, 1996)

Cre ("cis-acting replication element"): se trata de una estructura altamente estable tipo "stem-loop" de 55 nt de longitud aproximadamente. Este elemento es necesario para la replicación del ARN de los Picornavirus (Mason y cols., 2002), donde el *loop* del *cre*, a través de un motivo altamente conservado (AAACA), actúa de molde para la uridilación de la proteína VPg (3B) (Mason y cols., 2002, 2003; Rieder y cols., 2000; Nayak y cols., 2006). A su vez, el producto VPg uridilado (VPgpU o VPgpUpU) sirve de molde para la síntesis de la hebra negativa de ARN, esencial para la replicación (Paul y cols., 2003). Se ha observado complementación de la función de *cre* en *trans* (Tiley y cols., 2003). El VFA es el único miembro de la familia *Picornaviridae*, en el que el *cre* se ubica en la región no codificante (Liu, Wimmer y Paul, 2009; Steil y Barton, 2009).

IRES (sitio de entrada interna del ribosoma): región altamente estructurada que media la síntesis de proteínas virales de manera cap-independiente (Kuhn y cols., 1990; Belsham & Sonenberg, 1996, Jang y cols., 1990, Martínez-Salas y cols., 2002, Pelletier & Sonenberg, 1989; Belsham & Brangwyn, 1990). En el VFA presenta una longitud de 462 nt y está estructurado en 5 dominios (1-5 o G-L) (Belsham, 2005; Kuhn y cols., 1990) con un alto grado de conservación filogenética, lo cual apoya su relevancia. Se han identificado algunos motivos que son esenciales para mantener su actividad y organización estructural, así como para la interacción de algunas proteínas celulares (PTB, PCBP-2, ITAF45, eIF4G, eIF3 y eIF4B) (Martínez-Salas y cols., 2008).

1.2.2.2. Región codificante.

Constituye la mayor parte del genoma viral, con aproximadamente 7.000 nt de longitud, que da origen a una única poliproteína de alrededor de 2.330 aminoácidos, cuya traducción puede comenzar en dos codones AUG funcionales, separados entre sí por 84 nt (Beck y cols., 1983; Carroll Rowlands, y Clarke, 1984; Forss y cols., 1984). A medida que la traducción progresa, la poliproteína es procesada por proteasas virales, dando origen a 4 precursores L, P1, P2 y P3, que finalmente y tras el procesamiento completo (Fig. 1.2.3) van a dar a lugar a 15 proteínas virales maduras (Palmenberg, 1990). Las regiones L, P2 y P3 codifican precursores y proteínas maduras no estructurales, mientras que la región P1 codifica las proteínas estructurales que componen la cápside del virión.

Estos precursores se organizan de la siguiente manera:

L: esta región codifica a la primera proteína traducida a partir de la poliproteína viral, que es la proteasa *leader* (L). Presenta dos formas alternativas, Lab o Lb, dependiendo de cuál sea el codón de iniciación utilizado (AUG1 o AUG2, alternativamente) (Beck y cols., 1983; Forss y cols., 1984). Se ha demostrado la preferencia por el segundo codón funcional (Belsham, 1992), observándose que modificaciones en el AUG2 son deletéreas (Cao y cols., 1995). La proteína L tiene actividad proteolítica activa en *cis* y *trans* por la cual cataliza su propia separación de la poliproteína e inicia la proteólisis del factor de iniciación de la traducción eIF4F, dependiente de cap, lo que contribuye a una reducción drástica de la síntesis de proteínas celulares (*shut-off*) en las células infectadas (Devaney y cols., 1988; Medina y cols., 1993). La estructura tridimensional de esta proteína (Guarne y cols., 1998) permitió localizar los sitios catalíticos (Piccone y cols., 1995b; Roberts & Belsham, 1995). Recientemente se ha descrito una inhibición mediada por L^{pro} de la respuesta inmune innata (de Los Santos y cols., 2006).

P1-2A: Hacia el extremo 3' de la región L se encuentra la región P1, que codifica para las cuatro proteínas estructurales cuyos genes se denominan: 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) y 1D (VP1). El auto clivaje de la proteína L, libera el extremo N-terminal del precursor P1-2A, cuyo extremo C-terminal se produce por la auto catálisis de la proteína 2A. Más tarde la acción de la proteasa 3C sobre este precursor escinde la proteína 2A de los distintos componentes de P1 para dar lugar a las proteínas estructurales VP4 y VP2 (en forma de su precursor VP0), VP3 y VP1 que integrarán la cápside viral (Racaniello, 2007). Los polipéptidos VP4 y VP2 maduros son

originados por clivaje de VP0 durante el proceso de maduración de la cápside (Curry y cols., 1997).

P2: Esta región codifica para proteínas no estructurales 2A, 2B y 2C, involucradas en la replicación. Como se mencionó anteriormente, el procesamiento de la proteína 2A ocurre junto con el precursor P1-2A. Esta proteína, un péptido de 16 aminoácidos de longitud, cataliza en *cis* la escisión de P1-2A del precursor 2BC (Ryan y cols., 1991; Ryan & Flint, 1997). La proteasa viral 3C es la encargada de procesar el precursor 2BC para dar lugar a las proteínas 2B y 2C, que junto con la proteína 2A del virus integran la región P2. La proteína 2B contiene los determinantes del rango de huésped, ha sido asociada en VFA al bloqueo de secreción de proteínas cuando se coexpresa con 2C (Moffat y cols., 2007) pero no por sí sola (de Jong y cols., 2008). La proteína 2C está involucrada en la síntesis de ARN con posible actividad helicasa (Porter, 1993). En enterovirus se ha demostrado que las proteínas 2B y 2C se encuentran en complejos de replicación viral asociados a membrana (Bienz y cols., 1987; Bienz y cols., 1990).

P3: La región P3 codifica las proteínas no estructurales 3A, tres copias distintas de 3B (VPg), la proteasa 3C, y la polimerasa viral (3D), que es una ARN polimerasa ARN dependiente. La proteína 3C es la responsable de la mayoría de los clivajes de procesamiento primario y secundario de este precursor (Porter, 1993). En Picornavirus, la proteína 3A participa en la síntesis del ARN viral (Gromeier y cols., 1999, Takeda y cols., 1986), y en el anclaje a membranas, alterando su permeabilidad (Xiang y cols., 1998), inhibe la secreción de proteínas celulares (Doedens & Kirkegaard, 1995) y está implicada en replicación del ARN viral (Takeda y cols., 1986; Gromeier y cols., 1999). Se ha demostrado que deleciones o alteraciones en la secuencia de 3A pueden afectar a la virulencia del VFA y la patogenia de la enfermedad (Giraud y cols., 1990; Beard & Mason, 2000) o contribuir a la expansión del rango de hospedador (Nuñez y cols., 2001). En el genoma del VFA existen tres copias en tándem del gen 3B, que codifica para la proteína VPg (King y cols., 1980), que es uridilada y se une covalentemente al extremo 5' del ARN genómico del virus, y está implicada en la iniciación de la síntesis del ARN y probablemente también en encapsidación (Rowlands, 1999). Se ha demostrado que virus con alguna copia de 3B deletada tienen afectada la capacidad de sintetizar ARN cuando se multiplican en cultivo celular (Falk, Sobrino y Beck, 1992). La uridilación de VPg en picornavirus es necesaria para iniciar la síntesis del ARN viral (Gerber, Wimmer y Paul, 2001; Paul A.V., 2000). El proceso de uridilación en aftovirus es estrictamente dependiente de la presencia del precursor viral 3CD, del *cre* y de 3D, e independiente de la cola de poli(A) (Nayak y cols., 2005; Nayak y cols., 2006). La proteína 3C, principal proteasa

viral, del grupo de las serín proteasas relacionadas con la tripsina (Argos y cols., 1984; Bazan y Fletterick, 1988; Gorbalenya y Koonin, 1989), también es la responsable de la proteólisis de algunas proteínas celulares como la histona H3 (Falk y cols., 1990; Tesar & Marquardt, 1990) o los factores del inicio de la traducción eIF4A y eIF4G1 (Belsham y cols., 2000). La proteína 3D, que como hemos mencionado es la ARN polimerasa dependiente de ARN, es responsable de la replicación del ARN viral, aunque los requerimientos específicos para el reconocimiento de las moléculas de polaridad positiva y negativa se desconocen. Esta proteína es la encargada de la replicación del genoma del VFA (Newman y cols., 1979) y de la uridilación de 3B (Nayak y cols., 2005). La estructura tridimensional de la 3D del VFA ha sido experimentalmente determinada (Ferrer-Orta y cols., 2004), aunque, no ha sido identificada su región catalítica.

1.2.2.3. Región 3' no codificante.

Esta región se encuentra tras el codón de terminación de la poliproteína y presenta una longitud de aproximadamente 90 nt, estructurada en dos *stem-loops* (SLs) (Mason y cols., 2003; Witwer y cols., 2001), seguida de una cola de poli(A) de longitud variable (Chatterjee y cols., 1976; Sangar y cols., 1977). El poli(A) interviene en el inicio de la síntesis de ARN de polaridad negativa, a través de los residuos de adenilato terminales que actúan como molde con el que se aparea el iniciador 3B-pUpU; su eliminación afecta la infectividad del ARN de VFA (Sáiz y cols., 2001). Asimismo interviene, a través de una serie de proteínas que se unen a él, en la circularización del genoma necesaria para que tenga lugar la replicación (Barton y cols., 2001; Herold y Andino, 2001).

1.3. Ciclo de replicación.

El ARN genómico de los virus de la familia *Picornaviridae* es infeccioso (Belsham & Bostock, 1988), por lo que no requiere de las proteínas virales para iniciar el ciclo replicativo, que ocurre a nivel citoplasmático (Fig. 1.3). Tras la entrada del virus en la célula susceptible, el ARN viral es rápidamente traducido, originando una única poliproteína que es procesada mediante diversas proteasas virales y posiblemente celulares, para resultar en las proteínas virales maduras (Ryan y cols., 1989; Grubman y cols., 1984). La interacción entre proteínas celulares y virales, altera las funcionalidades de muchas de las proteínas celulares, provocando la inhibición del proceso traduccional celular y el bloqueo de los mecanismos de defensa de la célula hospedadora (Belsham, 2005). Estas reorganizaciones incluyen la proliferación de vesículas citoplasmáticas, que aunque su origen todavía no ha sido precisado, podrían provenir

del retículo endoplasmático y/o complejo de Golgi (Knox y cols., 2005; Monaghan y cols., 2004). Estos cambios facilitan la segunda fase del ciclo viral, la replicación del genoma, llevada a cabo por la ARN polimerasa dependiente de ARN (3Dpol). Finalmente, la formación de la cápside y su asociación con una molécula de ARN, genera nuevas partículas infecciosas (Grubman y cols., 1985).

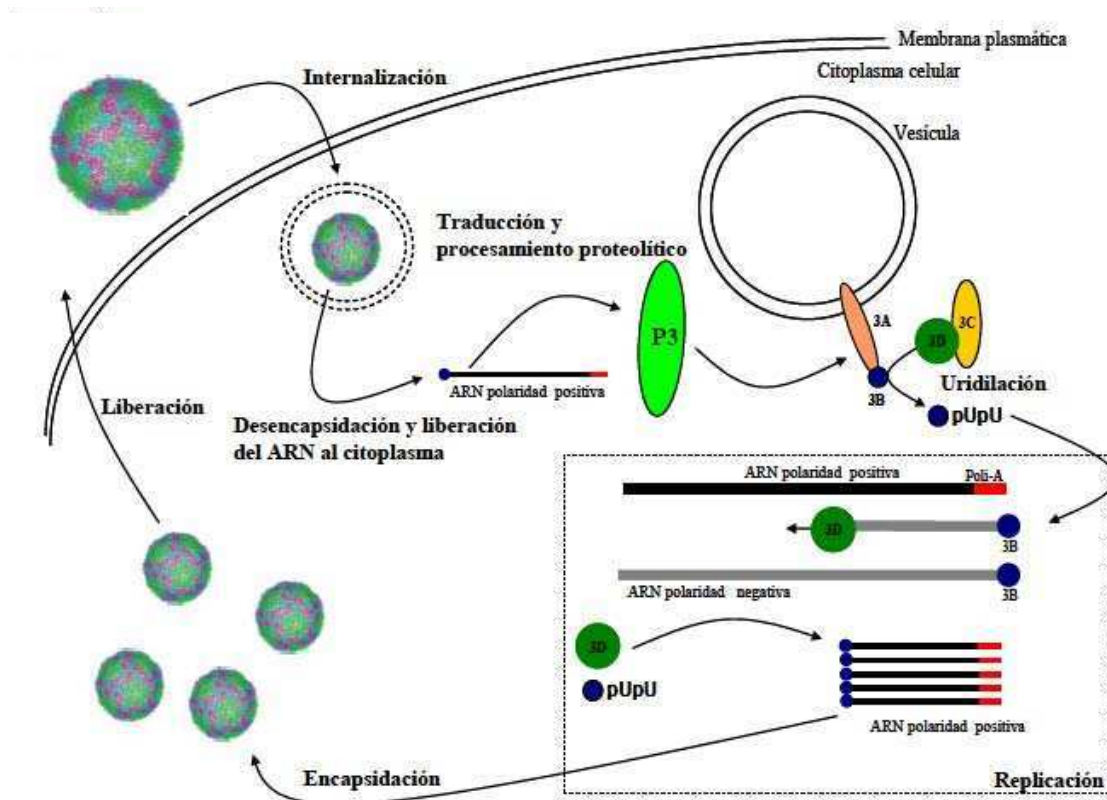


Figura 1.3. Representación esquemática del ciclo replicativo de picornavirus (ver explicación en el texto).

1.3.1. Entrada a la célula.

El número de partículas de VFA que se pueden unir por célula se estima entre 10³ - 10⁴ (Baxt y Bachrach, 1980). El reconocimiento de las células blanco por el VFA ocurre a través del triplete de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp), ubicado en el *loop* GH de la proteína VP1, que se une a una serie de integrinas, como $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 6$ y $\alpha\beta 8$, que actúan como receptores celulares (Robertson y cols., 1983; Fox y cols., 1989; Baxt y Becker, 1990; Mateu y cols., 1996; Neff y cols., 1998; Jackson y cols., 2000; 2002 y 2004; Baranowski y cols., 2003; Baxt y Rieder 2004; Burman y cols., 2006). Las integrinas son proteínas transmembrana heterodiméricas implicadas en adhesión y señalización celular. Están formadas por la asociación no covalente de una cadena α y una β (Takada y cols., 2007). La $\alpha\beta 6$ sería la más importante como receptor

(Dicara y cols., 2008), además esta integrina se expresa en bovino y ovino en células epiteliales susceptibles a la infección por VFA (Brown y cols., 2006; Monaghan y cols., 2005). Las integrinas constituyen el receptor utilizado por los aislamientos naturales del VFA para infectar hospedadores naturales (McKenna y cols., 1995; Monaghan y cols., 2005).

Los estudios de estructura viral revelan que el *loop* GH es una protrusión desordenada, expuesta y flexible (Acharya y cols., 1989; Verdaguer y cols., 1999) (Fig. 1.3.1), con el motivo RGD conservado rodeado de aminoácidos altamente variables (Carrillo y cols., 2005; Domingo y cols., 2004). Algunas de las posiciones adyacentes al RGD tienen importancia en el reconocimiento del receptor (Burman y cols., 2006; Mateu y cols., 1996).

Se han descrito otros receptores, como heparán sulfato (Baranowski y cols., 2000; Jackson y cols., 1996), y también variantes virales capaces de utilizar como receptor moléculas diferentes de heparán sulfato o integrinas (Baranowski y cols., 1998; Sá-Carvalho y cols., 1997).

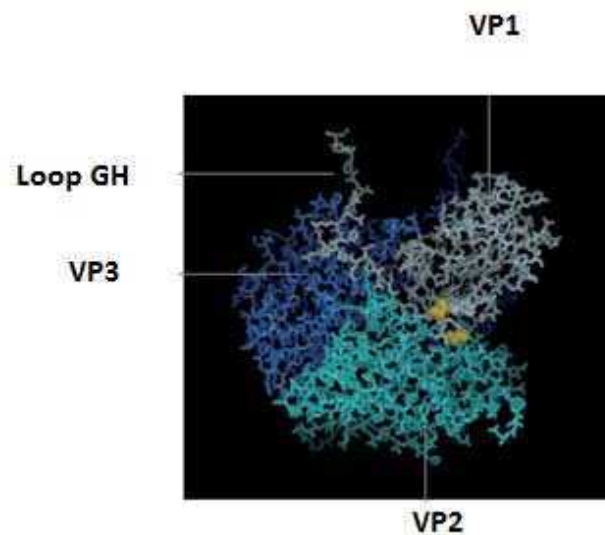


Figura 1.3.1. Representación de la estructura tridimensional de un protómero biológico del VFA, con el *loop* GH expuesto.

Tras su unión a integrinas, el virión es introducido en la célula mediante un mecanismo dependiente de clatrina (Berryman y cols., 2005; O'Donnell y cols., 2005; Martin-Acebes y cols., 2009), en un compartimento endosomal ácido, donde se produce el desensamble de la cápside en pentámeros liberando VP4 (Vasquez y cols., 1979), por la acción de fuerzas electrostáticas que generan la protonación de residuos de histidina en la proteína VP3 de la cápside donde la repulsión generada entre ellos ayuda a su disociación, con la consiguiente liberación del ARN vírico en el citosol (Ellard y cols., 1999). Este proceso parece estar inducido por acidificación en los endosomas (Carrillo y cols., 1984; Baxt, 1987). La sensibilidad del virión

de VFA a condiciones ácidas podría ser producto de una selección evolutiva para permitir la disociación de la cápside y la liberación del ARN genómico durante estas etapas iniciales de la infección (van Vlijmen y cols., 1998). El ARN se libera al citoplasma, unido covalentemente a la proteína VPg (Curry y cols., 1995, Ellard y cols., 1999). El mecanismo no está totalmente establecido, pero una vez en el citoplasma, se supone que es necesaria la separación de la proteína VPg del extremo 5' del ARN, para iniciar la traducción (Ambros y cols., 1978), aunque algunos autores han propuesto el inicio de la traducción con esta proteína unida al ARN (Golini y cols., 1980).

1.3.2 Traducción y procesamiento proteolítico.

La traducción del genoma del VFA es independiente de la estructura cap (7-metil-G) común a la iniciación de la traducción en eucariotas, y se realiza a partir de un sitio interno (IRES) que presenta una compleja estructura secundaria, y es capaz de unirse al ribosoma (Belsham, 1992), y a ciertas proteínas celulares, como PTBP (Luz y Beck, 1990), ITAF45 (Martínez-Salas y cols., 2001) y PCBP (Blyn y cols., 1997). La proteasa L también procesa al factor celular de inicio de la traducción, eIF4G, impidiendo que el ribosoma reconozca la estructura cap de los ARN celulares, y por lo tanto, su traducción (Devaney y cols., 1988). Las proteasas virales clivan además otras proteínas de la célula infectada que participan en procesos necesarios para la viabilidad celular, como factores de transcripción, histonas (H3), proteínas implicadas en el tráfico de membranas y reguladores del ciclo celular (ciclina A y ciclina B2), entre otros (Ryan y cols., 2004).

Una vez iniciada la traducción, esta prosigue generando una poliproteína de aproximadamente 2330 aminoácidos que se procesa cotraduccionalmente por la acción *in cis* y *in trans* de las diversas proteasas virales, dando origen a diferentes productos intermedios y a las proteínas virales maduras, que se mencionaron anteriormente. La proteasa 3C también participa en el procesamiento del factor eIF4G (Belsham y cols., 2000).

Las proteasas del VFA son:

L: pertenece al grupo de la papaína (Guarne y cols., 1998) y se encuentra presente únicamente en los géneros Aphthovirus y Erbovirus. Cataliza su propia escisión del resto de la poliproteína viral P1-P2-P3 (Strebel y Beck, 1986; Medina y cols., 1993). Esta proteína es también responsable de la ruptura del factor de iniciación de la traducción celular eIF4G (Devaney y cols., 1988; Strebel y Beck, 1986).

3C: responsable del resto de rupturas proteolíticas de la poliproteína viral. La proteasa 3C es una serín proteasa de la familia de la tripsina (Gorbalenya y Koonin, 1989) y produce la ruptura primaria de la unión entre 2C y 3A, en las etapas iniciales de la traducción, y posteriormente

realiza la proteólisis de los distintos precursores proteicos virales que dan lugar a las proteínas de la cápside (excepto la ruptura entre VP4 y VP2 que tiene lugar en la etapa de encapsidación), y a las diferentes proteínas no estructurales (Fig. 1.3.2).

2A: se consideraba una proteasa, pero ahora se sabe que es responsable de liberar el precursor P1-2A de 2BC-P3 mediante un mecanismo de modificación de la maquinaria traducción (Donnelly y cols., 2001; de Felipe y cols., 2003; Ryan y cols., 2004).

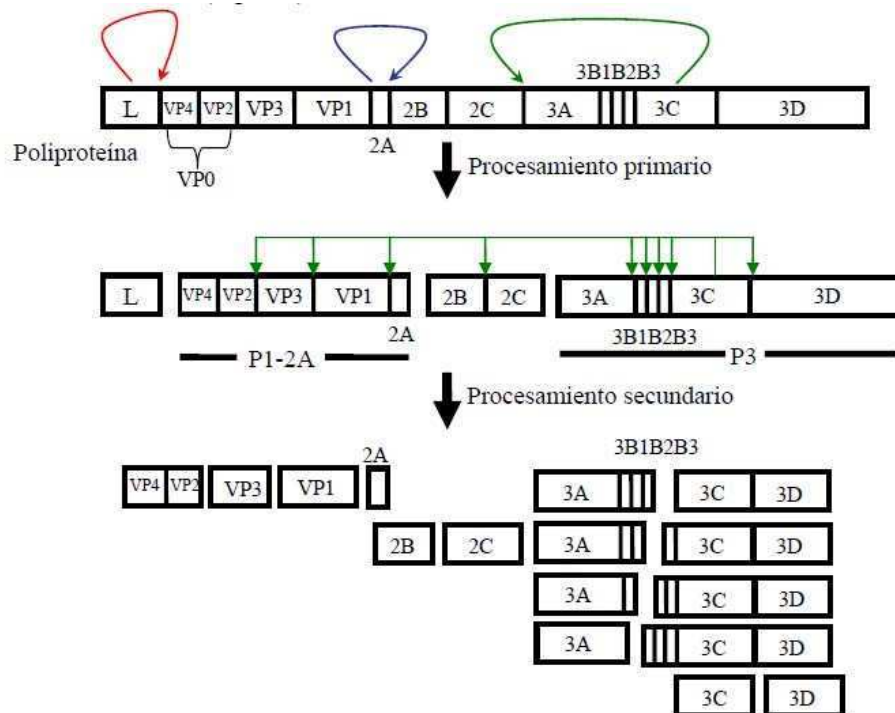


Figura 1.3.2. Representación esquemática de la acción de las proteasas en el procesamiento de la poliproteína del VFA. Se producen tres procesamientos en *cis* a medida que se sintetiza la poliproteína. La separación entre L y P1-2A se produce por el corte de L sobre sí misma (flecha roja). El corte entre P1-2A y 2BC se produce por autocatálisis de 2A (flecha azul). El corte entre 2BC y P3 lo realiza 3C, que posteriormente ejecuta las escisiones de las demás proteínas maduras a partir de sus precursores (flechas verdes). Basado en Ryan y cols., 2004.

1.3.3 Replicación del ARN.

La información relativa al mecanismo de replicación del ARN del VFA es escasa, y en general se infiere, básicamente, de lo que se conoce sobre poliovirus. El ARN se copia por la acción de la ARN polimerasa ARN-dependiente, codificada en la región 3D del genoma (Polatnick y Arlinghouse, 1967; Martínez-Salas y cols., 1985; Ferrer-Orta y cols., 2004 y 2006). La polimerasa 3D presenta una baja fidelidad debido a la ausencia de actividad correctora (o *proofreading*), lo que explica la gran variabilidad genética observada en el VFA (Domingo y cols., 2001). La proteína 3Dpol sintetiza tanto la cadena positiva como la negativa del ARN viral

y cataliza también la uridilación del péptido 3B, para que éste actúe como iniciador de la síntesis de ARN de polaridad positiva. Su estructura ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (Ferrer-Orta y cols., 2006; Ferrer-Orta y cols., 2004; Ferrer-Orta y cols., 2007).

La replicación del genoma en picornavirus está asociada a la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi (Barco y Carrasco, 1995; Schlegel y cols., 1996; Teterina y cols., 1997; Bolten y cols., 1998). El precursor 3AB actúa en el reclutamiento de la proteína 3D y del precursor 3CD hacia la membrana (Paul 2002). Este último tiene actividad de proteasa, y facilitaría la unión de 3D al ARN viral a través de distintos dominios de la proteína 3C (Harris y cols., 1994). El modelo propuesto para representar el proceso supone un tapiz de moléculas de polimerasa 3D recubriendo la membrana externa del retículo endoplasmático, formando una malla catalítica (Lyle y cols., 2002). La mayoría de las proteínas no estructurales y sus precursores, junto con el ARN, también participarían de esta estructura, llamada “complejo de replicación” (Parsley y cols., 1997; Xiang y cols., 1995; Barnejee y cols., 2001; Echeverri y cols., 1995; Paul y cols., 1994; Giachetti y cols., 1992), el cual facilita el proceso replicativo, localizando en la misma estructura celular a todos los componentes necesarios para la replicación del ARN viral (Bienz y cols., 1992).

La proteína VPg unida covalentemente a todas las moléculas de ARN viral (Ambros y Baltimore, 1978), actúa en el inicio de la replicación (Paul y cols., 1998; Ferrer-Orta y cols., 2006). El primer paso para la iniciación de la síntesis del ARN viral es la uridilación de VPg por parte de 3D, mediante la cual se adiciona un residuo de uridina-5'-monofosfato (UMP) a la Tyr que se encuentra en posición 3 del péptido VPg (Ferrer-Orta y cols., 2006, Nayak y cols., 2005, Paul y cols., 1998). El mecanismo de uridilación difiere en función de la polaridad del ARN a sintetizar. Para la síntesis de ARN negativo la uridilación sería mediada por el poli-A (Murray y Barton, 2003; Paul y cols., 2003), mientras que la uridilación que utiliza como molde la estructura del “*cre*”, solo sería necesaria en la síntesis de ARN+ (Murray y Barton, 2003). Sin embargo, otros autores han relacionado la uridilación de 3B mediada por “*cre*” a la síntesis de ARN de ambas polaridades (Van Ooij y cols., 2006). El proceso de uridilación es estimulado por el precursor 3CD (Paul y cols., 2000; Paul y cols., 2003).

Varios modelos tratan de explicar el inicio de la síntesis de las moléculas de polaridad negativa y todos ellos contemplan el hecho de que el ARN genómico sirve de molde para la síntesis de unas pocas moléculas de ARN-, para lo cual la proteína 3B serviría de cebador. Estas cadenas de ARN- serían, a su vez, molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN+, que llevarían también unidas covalentemente en su extremo 3' a la proteína 3B uridilada empleada como cebador en dicha síntesis. Debido a este mecanismo, en el interior de la célula infectada se acumula mayor cantidad de moléculas de ARN+ que de ARN-. Para que comience la síntesis

de la cadena negativa de ARN es necesario que cese la traducción de la molécula de ARN (Gamarnik y Andino, 1998).

1.3.4 Encapsidación y maduración.

El ciclo de replicación finaliza con los procesos de encapsidación de la molécula de ARN genómico y de la maduración de la cápside, mediante el clivaje del precursor VP0, dando lugar a las proteínas VP4 y VP2. Se ha postulado, para poliovirus, que existe una señal de empaquetamiento en *cis* en la molécula de ARN de polaridad positiva, y únicamente las moléculas de ARN positivo unidas a la proteína VPg son encapsidadas (Nomoto y cols., 1977; Novak y Kirkegaard, 1991). El clivaje de VP0 es autocatalítico y es esencial para la formación de virus infectivo; cuando ese proceso de maduración no se completa, no se realiza la liberación del ARN al citoplasma celular (Knipe y cols., 1997).

Los diferentes modelos que se postulan para explicar el ensamblaje de los nuevos viriones, ya fuera por formación de cápsides vacías dónde luego entraría el ARN, o por estructuración de los pentámeros con el ARN para formar el pro-virión (revisado en Grubman y Baxt, 2004), coinciden en apuntar la necesidad de la maduración de VP0 en VP4 y VP2, una vez ensamblada la cápside (Arnold y cols., 1987; Knipe y cols., 1997). Otra modificación descrita es la miristilación del extremo amino del precursor VP0, que actuaría en la localización del precursor en las membranas celulares, donde tiene lugar la replicación del ARN viral así como en el correcto procesamiento y ensamblaje de las subunidades de la cápside (Chow y cols., 1987).

1.4. Diversidad del VFA.

El VFA, como la mayoría de los virus de genoma ARN, se caracteriza por presentar una alta variabilidad genética (Domingo y cols., 2003; Domingo y cols., 1990), que se origina principalmente en la ausencia de actividad correctora de la ARN polimerasa dependiente de ARN. La tasa de mutación de los virus a ARN, calculada a partir del número total de sustituciones de nucleótidos por el número total de nucleótidos en el genoma por ronda de replicación, está en el rango de 10^{-3} a 10^{-4} (Weissman, 1989). Para el VFA la tasa de fijación de mutaciones para el gen de la VP1 se ha calculado en $<0,04 \times 10^{-2}$ a $4,5 \times 10^{-2}$ sustituciones por nucleótido por año en la fase aguda y entre $0,9 \times 10^{-2}$ y $7,4 \times 10^{-2}$ sustituciones por nucleótido por año en las infecciones persistentes (Sobrino y cols., 1983; Gebauer y cols., 1988; Malirat y cols., 1994).

Esta alta variabilidad genera poblaciones de VFA que han sido definidas como distribuciones dinámicas complejas de mutantes relacionados entre sí, a las cuales se las

denomina cuasiespecies (revisión en Domingo y cols., 2006). En esas poblaciones de cuasiespecies existe un equilibrio que no es sencillo entre la alta tasa de mutación inherente a la replicación del ARN y una continua competición entre las mutantes, que resulta en la mayor adaptabilidad de aquellos con más eficacia biológica o *fitness* frente a las diferentes presiones selectivas del ambiente. La consecuencia de estos procesos es la gran flexibilidad adaptativa que presentan los virus ARN (Domingo y Holland, 1997), que ha llevado, en el VFA, a cambios fenotípicos como la adquisición de resistencia a anticuerpos monoclonales (Lea y cols., 1994), a fármacos (Sierra y cols., 2007), a vacunas peptídicas (Taboga y cols., 1997), o cambios en rango de hospedador (Giraud y cols., 1990; Nuñez y cols., 2001), que derivan de cambios genéticos mínimos.

1.4.1. Variabilidad genética.

Como consecuencia de su estructura poblacional de cuasiespecie, existen variantes genéticas en las poblaciones del VFA presentes en la naturaleza (Barteling y Woortmeyer, 1987). La primera comparación entre los genomas de VFA se realizó mediante un ensayo de hibridación competitiva de los ácidos nucleicos. El análisis de ARN de los virus de los serotipos O, Ay C mostró una homología del 44-65% (Dietzshold y cols., 1971). En 1977, también por medio de esta técnica, Robson y cols. reportaron de que los siete serotipos de VFA se pueden clasificar en dos grupos: uno incluye los tipos O, A, C, y Asia1 y el otro grupo incluye los tres tipos de Sudáfrica (SAT1, 2 y 3).

Esta variación que se observa en la naturaleza, también se encuentra cuando se somete a los virus a pasajes en cultivos celulares, tanto en presencia de anticuerpos (Carrillo y cols., 1989), como en ausencia de los mismos, y también en cultivos celulares infectados de forma persistente (Diez y cols., 1989). Asimismo, se han recuperado variantes genéticas a lo largo de infecciones persistentes en animales inoculados experimentalmente (Gebauer y cols., 1988, Malirat y cols., 1994). Inclusive es posible encontrar en la literatura, trabajos que evidencian la existencia de poblaciones genéticamente heterogéneas durante un brote. (Piccone y cols., 1988, Malirat y cols., 2007). Además de este tipo de mutaciones que llevan a un *drift* antigénico, hay estudios (Heath y cols., 2006) que evidencian la ocurrencia de recombinaciones en *hotspots* de recombinación a los extremos 3' y 5' de las regiones de P1.

1.4.2. Variabilidad antigénica y sitios antigénicos.

Las variaciones a nivel genómico implican eventualmente cambios a nivel fenotípico que se manifiestan como sustituciones de aminoácidos en las proteínas no estructurales, alterando manifestaciones tales como rango de huéspedes, virulencia, etc., tanto en infecciones *in vivo*

como *in vitro*, y estructurales, en donde pueden modificarse dominios que interactúan con los componentes del sistema inmunológico.

De hecho, el VFA es un virus antigénicamente heterogéneo, y se han clasificado a nivel mundial 7 serotipos, con diferencias importantes en sus propiedades antigénicas e inmunológicas. Estas diferencias entre los serotipos tienen como consecuencia el hecho de que los animales recuperados de la infección causada por un serotipo viral o vacunados contra un serotipo sean susceptibles a la infección un virus perteneciente a otro serotipo. Inclusive, dentro de los serotipos se han identificado numerosas cepas que poseen distintos grados de relación serológica y antigénica las cuales no son capaces en todos los casos de conferir inmunidad contra otras variantes del mismo serotipo (Pereira, 1977; Mateu y cols., 1988).

Esto sugiere que la diversidad antigénica es de gran importancia para controlar la enfermedad y es una característica cada vez más considerada en la selección de cepas para ser utilizadas en la fabricación de vacunas (Mattion y cols., 2004).

La estructura terciaria en forma de barril β compuesto por 8 cadenas β antiparalelas conectadas por bucles de longitud variable compartida por los polipéptidos VP1-3 es la que define la antigenicidad de cada serotipo. El principal sitio antigénico, implicado en la neutralización de la infectividad viral, se localiza en el *loop* G-H de VP1, localizado en las posiciones 140-160 aproximadamente, dependiendo del serotipo (Strohmaier y cols., 1982; Bittle y cols., 1982; Pfaff y cols., 1988; Mateu y Verdaguer 2004; revisión en Baranowski y cols., 2001). El triplete RGD, que como mencionamos anteriormente interviene en el reconocimiento del receptor, se localiza en la zona central de este *loop*. También han sido identificados otros sitios relevantes en la región P1, algunos localizados en el extremo C-terminal de VP1, el cual es continuo e independiente del sitio principal en el *loop* G-HA en el serotipo C, pero no en el serotipo O (Bittle y cols., 1982; Parry y cols., 1990), y otro sitio discontinuo que comprende los residuos de VP1, VP3 y VP2 (Lea y cols., 1994; Barnett y cols., 1998; Mateu y cols., 1990; Pfaff y cols., 1988; revisiones en Baranowski y cols., 2001 y en Mateu y Verdaguer, 2004).

1.5. Respuesta inmune contra el virus de la fiebre aftosa.

El VFA, como consecuencia del proceso infeccioso, induce una respuesta inmune protectora para posteriores desafíos frente al virus. Esta respuesta inmune es estimulada específicamente e induce una eficiente protección frente a reinfecciones con virus homólogos o relacionados antigénicamente (Collen, 1994; McCullough y cols., 1992).

La inducción de una respuesta inmune humoral específica implica el reconocimiento de epítopes presentes en la partícula viral por parte de los linfocitos B para producir anticuerpos específicos. Los animales infectados presentan altos niveles séricos de anticuerpos específicos

con actividad neutralizante, que según la especie pueden persistir hasta 18 meses luego de la infección (Wigdorovitz y Sadir, 1996). La importancia de los anticuerpos neutralizantes para inducir protección frente a fiebre aftosa ha sido documentada ampliamente (Bachrach y cols., 1975; Bittle y cols., 1982; Kleid y cols., 1981; Laporte y cols., 1973; Strohmaier y cols., 1982; Pay y Hingley, 1987; Collen, 1994; Periolo y cols., 1993; Robiolo y cols., 1995). Niveles de anticuerpos IgM específicos en suero se detectan a partir del 4^{to} día post-infección, o inclusive más temprano en animales inoculados intradermolingualmente, y del tipo IgG entre 4-7 días (Francis & Black, 1983; Salt, 1993). Se ha descrito una buena correlación entre los niveles de anticuerpos específicos medidos *in vitro* y la protección *in vivo* (Van Bekkum, 1969; Van Maanen and Terpstra, 1989; Robiolo y cols., 1995 y 2010)

La respuesta inmune inducida en mucosas también ha sido objeto de estudio, dada la importancia de la ruta oro-faríngea como principal vía de infección natural del VFA (Alexandersen & Donaldson, 2002; Francis & Black, 1983). La detección de anticuerpos IgA específicos en fluido oro-faríngeo, como inducción de una respuesta inmune local y sistémica, ha sido descrita en cerdos inmunizados con altas dosis de virus inactivado o con péptidos sintéticos. Esta detección se ha correlacionado recientemente con la inducción de una respuesta protectora eficiente (Cubillos y cols., 2008; Eble y cols., 2007; Parida y cols., 2006; Parida y cols., 2007).

El reconocimiento de epítopes T tras el procesamiento antigénico y presentación en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II es importante para la generación de la respuesta inmune humoral (Collen, 1994). No obstante, animales con títulos de anticuerpos significativos pueden no estar protegidos, mientras otros con títulos de anticuerpos neutralizantes bajos o nulos, pueden llegar a estarlo (McCullough y cols., 1992; Sobrino y cols., 2001; Liebermann y cols., 1993), lo que sugiere que la protección estaría mediada, además, por otros componentes de la inmunidad, que expliquen la protección del animal en ausencia de anticuerpos neutralizantes detectables, como puede ser la estimulación de una respuesta inmune celular (Brown y Graves, 1959; Becker, 1994). En este sentido, el estudio de la contribución de otros mecanismos inmunes, como la respuesta celular mediada por MHC de clase I, a la protección frente al VFA ha sido de gran importancia. La identificación y caracterización de epítopes T en la secuencia del VFA (Collen y Doel, 1990; Bittle y cols., 1982; van Lierop y cols., 1995) ha sido muy importante para entender la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T y su vía de presentación antigénica (Collen y cols., 1991; Garcia-Briones, y cols., 2004; Glass y cols., 1991; Rodriguez y cols., 1994). Se han mapeado epítopes T funcionales a lo largo de la secuencia de las cuatro proteínas capsidales (Filgueiras, 2000). Por otro lado, se sabe que las citoquinas, especialmente el interferón, ejercen

importantes funciones en el sistema inmune para controlar la enfermedad y su estimulación es característica de una respuesta antiviral mediada por células T CD4+ (Th1) (Moraes y cols., 2003; Zhang y cols., 2002).

1.6. Vacunación contra el VFA.

Ya desde tiempos tempranos desde la primera descripción de la etiología del VFA, se abordó la preparación de vacunas que confirieran protección frente a la enfermedad, y si bien existieron intentos de elaborarla con cepas atenuadas aisladas de la naturaleza o atenuadas mediante pasajes en animales o en cultivos celulares (Barteling, 2004), las vacunas contra el VFA, que se usan en la actualidad y han permitido erradicar la enfermedad en numerosos países se elaboran a partir de la inactivación química de partículas virales producidas principalmente en cultivos celulares. Estas vacunas se preparan por infección de células BHK-21, a nivel industrial (Stoker y Macpherson 1964), incluyendo cepas de diferentes serotipos virales que sean necesarias dependiendo de la circulación o riesgo de circulación existente o identificado (Rweyemamu, 1984; Paton y cols., 2005; Mattion y cols., 2009). Los sobrenadantes de los cultivos se clarifican por filtración para eliminar restos celulares y se concentran por precipitación del virus con polietilenglicol (PEG) o por ultrafiltración. El virus se inactiva con etilenimina binaria (BEI) que ha sustituido progresivamente a las vacunas basadas en la inactivación del antígeno viral con formaldehído (Bahnemann, 1975; Bahnemann 1990, Barteling, 2004). A pesar de la comprobada eficacia de las vacunas inactivadas, la duración de la protección, los títulos de anticuerpos neutralizantes, y la afinidad promedio de la respuesta inducida por una vacuna, es siempre más baja a la inducida por la infección natural (Doel, 2003). Para superar esta dificultad, se utilizan sustancias adyuvantes que actúan como vehículos y como inmunoestimuladores, tales como el adyuvante incompleto de Freund (Freund y cols., 1948), o más recientemente la saponina. En este sentido ha sido demostrado que los adyuvantes oleosos confieren estados de protección más duraderos (Smitsaart y cols., 2000). Otra condición esencial para la eficacia de las vacunas, es la integridad de las partículas virales 140S (OIE, 2012).

Las vacunas inactivadas convencionales presentan algunas desventajas, entre las cuales la necesidad de manipulación de virus infeccioso es una de las más notorias, por lo que se ha trabajado desde hace bastante tiempo en diferentes aproximaciones para el desarrollo de nuevas vacunas. Por ejemplo, se han realizado estudios con vacunas basadas en péptidos sintéticos (Anderer and Schlumberger, 1965; Cubillos y cols., 2008; Taboga y cols., 1997; Francis, 1990; Bittle y cols., 1982, Shieh y cols., 2001; Mulcahy y cols., 1990, Zamorano y cols., 1994), en donde se ha demostrado recientemente que puede mejorarse la respuesta inmune

asociándolos a epítopes T-colaboradores (Th) promiscuos (Wang y cols., 2002), o bien diseñando péptidos de modo tal que se logre la correcta exposición de sitios antigénicos discontinuos (Villen y cols., 2002); también se ha abordado la generación de vacunas a subunidades proteicas, mediante la inoculación de proteínas inmunogénicas producidas por técnicas de ADN recombinante (Strohmaier y cols., 1982; Abelson, 1982; Broekhuisen y cols., 1986), incluyendo proteínas de fusión con antígenos foráneos, y nuevas vacunas atenuadas (Chinsangaram y cols., 1998; Mason y cols., 1997). Otras metodologías incluyen vacunas producidas a partir de partículas virales vacías (VLPs) (Abrams y cols., 1995; Lewis y cols., 1991; Grubman y cols., 1993). Si bien se cuenta con resultados promisorios, hasta la fecha ninguna de estas metodologías se ha mostrado completamente satisfactoria.

Recientemente se han iniciado estudios para analizar el uso de vectores virales no replicativos junto con estrategias de *prime-and-boost*, que se muestran como una alternativa interesante de aplicación de inmunógenos recombinantes de nueva generación en la lucha contra la fiebre aftosa (D'Antuono y cols., 2010; Romanutti y cols., 2013).

1.7. El uso de la genética reversa para estudios en virología.

El estudio de los virus y sus interacciones con las células huésped y organismos se ha beneficiado en gran medida de la capacidad de diseñar mutaciones específicas en el genoma viral, técnica conocida como genética reversa. En el caso de los virus a ARN de polaridad positiva, se pueden generar nuevos virus a partir de un plásmido bacteriano que contiene una copia completa del ADN complementario (ADNc) al genoma viral. Estos ADNc de copia completa, conocidos como “clones infecciosos”, sirven como templado para la producción de moléculas de ARN usando una enzima ARN polimerasa ADN dependiente. La introducción de dichos ARNs en células eucariotas por técnicas de transfección resulta en la producción de virus infeccioso.

El desarrollo de un sistema de genética reversa para varios virus de ARN y de ADN permite la introducción de mutaciones, inserciones y deleciones diseñadas en el genoma de los virus, de manera que virus genéticamente alterados pueden ser creados en el laboratorio para expresar características fenotípicas específicas.

La generación y aplicación de clones infecciosos está ampliamente distribuida y se cuentan con estas herramientas tanto para virus vegetales como animales (Racaniello y Baltimore 1981; van der Werf y cols., 1986; Chapman S, y cols., 1991; Zimmermann y cols., 1994; Angell y Baulcombe, 1997; van Dinten y cols., 1997; Gritsun y Gould, 1998; Mendez y cols., 1998).

1.7.1 Aplicación de técnicas de genética reversa en estudios en Picornavirus.

La aplicación de la genética reversa para estudios de virus de la Familia Picornaviridae, fue posible gracias a los primeros estudios de tropismo de poliovirus realizados hace más de 50 años, por Holland y cols. (1959) quienes demostraron la capacidad de este virus de completar una ronda de replicación luego de la transfección con ARN viral de células no permisivas. Posteriormente los estudios de Racaniello y Baltimore (1981) que demostraron que una copia clonada de ARN genómico completo (*full-length cDNA*) de poliovirus transfectada en células permisivas de mamíferos, producía poliovirus infeccioso, sirvieron de base para los análisis posteriores de los picornavirus utilizando genética reversa, y fueron los primeros estudios de genética reversa en virus de ARN de cadena positiva.

Este primer clon de ADNc infeccioso del poliovirus tipo1 se construyó mediante la digestión parcial del ARN del genoma completo de poliovirus y la posterior religación de subclones que se superponían resultando en la formación de un ADNc de longitud completa, flanqueado por terminaciones de oligo(GC), insertado en el sitio PstI del plásmido pBR322. Este clon poseía una terminación de poli(A) de 37 nucleótidos y se colocó con orientación opuesta a la dirección de transcripción del gen de resistencia a ampicilina en cual se insertó. Aunque el plásmido pBR322 carece de señal de transcripción específica de eucariotas, la transfección de este plásmido recombinante en células de primates (CV-1) produjo virus infeccioso en cantidad significativa (aproximadamente 5 unidades formadoras de placa por microgramo de ADN).

Un estudio posterior demostró que un ADNc que carecía de los primeros 115 nucleótidos del genoma, no resultaba infeccioso, y esta fue la primera aplicación de la genética reversa al análisis de los Picornavirus, que permitió sugerir que el extremo 5' del genoma, el cual se sabía que no codifica para proteínas, contenía señales importantes para la replicación viral (revisado en Xiang y cols., 1997). Posteriormente se siguió avanzando en los estudios y metodologías, lo cual permitió aumentar el rendimiento con el cual se obtenían clones infecciosos, así como la infectividad de los mismos, por ejemplo realizando la transfección de células COS-1 con clones de ADNc preparados en plásmidos que contenían señales de transcripción y replicación del virus SV40 (Semler y cols., 1984), o aplicando la polimerasa purificada del bacteriófago T7, y la construcción clonada bajo la acción del promotor T7 (Van der Werf y cols., 1986) o bajo el promotor SP6 (Mizutani and Colonno, 1985), demostrando la capacidad de los sistemas *in vitro* como sistemas alternativos de expresión. Desde entonces varios estudios se realizaron, utilizando estos sistemas, los cuales permitieron avanzar en los conocimientos acerca de la intervención de las secuencias no

codificantes de los extremos 3' y 5' en la infectividad de poliovirus y otros picornavirus (revisión en Evans, 1999).

La mayoría de los estudios de genética reversa utilizan las polimerasas de SP6 o T7 para la síntesis del genoma completo de ARN *in vitro*, a partir del ADNc, y transfección de las células utilizando DEAE-dextrano, electroporación, o reactivos comerciales como la lipofectamina. Mejoras similares también se han logrado con respecto a la tecnología empleada para la generación de ADNc de longitud completa, como por ejemplo las estrategias de clonación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (Lindberg y cols., 1997) que facilitan el aislamiento y la clonación de genomas de aislados clínicos representativos permitiendo la generación de clones infecciosos

La aplicación de la genética reversa, ha impactado en la obtención de resultados importantes en cuanto al conocimiento de los mecanismos y factores que intervienen en la replicación de los Picornavirus (revisiones en Wimmer y cols., 1993; Sarnow y cols., 1990).

Las estrategias que se aplican es los estudios de genética reversa pueden agruparse en la mutagénesis aleatoria o semi-aleatoria de un ADNc clonado, la construcción de genomas recombinantes (incluyendo la mutagénesis en *cassette*), el desarrollo de sistemas de expresión basados en picornavirus y, en menor medida para Picornavirus, la mutagénesis sitio dirigida. La capacidad para manipular intermediarios del genoma completo a partir de la copia del ADNc, abre la posibilidad de eliminar genes para el estudio de su función, de realizar la mutagénesis dirigida para determinar los factores genéticos potenciales de virulencia o la inserción de genes heterólogos de interés y el uso de estos virus recombinantes como vectores de genes (revisión en Evans, 1999).

La genética inversa se ha utilizado en gran variedad de aplicaciones, como la atenuación de virus, la modificación de la especificidad de hospedador y la generación de virus con replicación deficiente. Estas estrategias también pueden aplicarse al desarrollo de nuevas estrategias vacunales y se utilizan mucho en la caracterización de la estructura y la función de genes víricos individuales y secuencias de codificación.

1. 7.2 Estudios en el VFA.

A pesar de haber sido el primer virus descubierto, el VFA se encuentra mucho menos estudiado que otros picornavirus, como por ejemplo el virus de la poliomielitis. La utilización de un sistema de genética reversa es muy útil para la experimentación e investigación a nivel molecular con el VFA y a fin de evaluar los efectos de modificaciones en las proteínas virales o en las zonas no codificantes de su genoma en un contexto fisiológico similar a una infección viral.

Algunos grupos de investigación han reportado la construcción de clones infecciosos de cepas específicas. El primer clon infeccioso del virus de fiebre aftosa fue construido por Zibert y cols., 1990 para virus serotipo O, y, posteriormente se obtuvieron clones de las cepas A12 (Rieder y cols., 1993), H99 (Liu y cols., 2004), A24 (Rieder y cols., 2005), y ZIM/7/83 (Van Rensburg y cols., 2004). En los dos últimos casos se obtuvieron transcritos quiméricos utilizando un sistema de transcripción *in vitro* que emplea la ARN polimerasa del bacteriófago T7. También ha sido descrita la obtención de virus quiméricos del VFA (Rieder y cols., 1993; Mason y cols., 1997; Almeida y cols., 1998; Saiz y cols., 2001; van Rensburg and Mason 2002; Fowler y cols., 2008).

En un trabajo realizado con un clon infeccioso del VFA, se ha diseñado por genética reversa una cepa atenuada con la proteasa L completamente deletada, pero que es capaz de replicar (Piccone y cols., 1995a), aunque la inoculación de este virus en ganado vacuno no desencadenó una respuesta protectora satisfactoria

Recientemente se han reportado trabajos donde la obtención de un clon infeccioso del VFA se realiza utilizando una línea celular que expresa en forma constitutiva a la ARN polimerasa T7 (Zheng y cols., 2009) y también un sistema de genética reversa basado en la ARN Polimerasa I (Chang y cols., 2009).

La disponibilidad de un clon infeccioso del VFA facilita la generación de virus quiméricos recombinantes que donde pueden insertarse fragmentos significados epidemiológicos e inclusive presentar un espectro antigénico más amplio, a partir de sustituciones específicas. Además, tales clones de longitud completa del ARN del VFA son útiles para comprender la replicación del virus, la patogenicidad y abren el camino para el desarrollo de nuevas vacunas (vanRensburg y Mason, 2002; Boyer y Haenni, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El trabajo tiene como objetivo el diseño y construcción de un sistema de genética reversa del virus de la Fiebre Aftosa, en base a una copia en ADN del genoma completo clonada río abajo del promotor de la polimerasa T7 y un replicón derivado del mismo a través del reemplazo de la región codificante de las proteínas virales estructurales por el gen reportero luciferasa.

El clon de genoma completo (*full length*) tendrá la potencialidad de producir partículas virales infectivas, luego de transfección de ARN transcrito a partir del promotor de la polimerasa T7. A diferencia de éste, el replicón, no poseerá la capacidad de generar viriones, lo cual posibilita su utilización en estudios moleculares sin los riesgos asociados a la manipulación del virus.

2.2. Objetivos específicos

- Diseño y construcción de un clon de genoma completo del VFA basado en la secuencia de la cepa O1/Campos.
- Evaluación de la capacidad del clon para generar virus infeccioso en células BHK-21, en un laboratorio de nivel de bioseguridad NBS 3A.
- Construcción de un replicón derivado del clon completo, mediante el reemplazo de la región codificante de las proteínas virales estructurales (P1) por el gen reportero luciferasa.
- Evaluación del replicón en células BHK-21 por medición de la actividad del gen reportero luciferasa.
- Puesta a punto de una técnica de cuantificación de la síntesis de ARN a partir de estos clones por PCR en Tiempo Real.

2.3. Hipótesis de trabajo

La obtención de este sistema de genética reversa permitirá contar con herramientas de gran valor para generar virus genéticamente modificados para el estudio de las diferentes funciones de las proteínas virales, así como de distintas estructuras presentes en zonas no codificantes del genoma en el ciclo de replicación y en la interacción con el huésped. El sistema generado será también apto para estudios de generación de virus genéticamente defectivos que muestren fenotipo atenuado, modificaciones antigénicas específicas o generación de secuencias “marcadas” con aplicaciones vacunales.

La disponibilidad de un clon infeccioso expandirá las posibilidades de investigación y experimentación, posibilitando de esta manera nuevas líneas de investigación. Adicionalmente, la construcción de un replicón incapaz de generar viriones, pero que permita medir la actividad de un gen reportero incorporado en el “*background*” genómico del VFA o la cuantificación del nivel de ARN viral por medio de PCR en Tiempo Real, permitirá evaluar los efectos de modificaciones en las proteínas virales o en las zonas no codificantes del genoma en un contexto fisiológico similar a una infección viral sin los riesgos asociados a la manipulación del virus.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Virus, plásmidos y células utilizadas

Se trabajó con la cepa O1/Campos del virus de la fiebre aftosa, obtenido del Laboratorio de SENASA.

Los plásmidos utilizados en distintas etapas del clonado fueron:

1. pGEMT-Easy (Promega)
2. pBluescript SKII (Stratagene)
3. pSFI (Sage y cols., 1998)
4. pKF4 (Hashimoto-Gotoh y cols., 1995)

Las transfecciones se realizaron sobre células BHK-21 clon 13, crecidas en monocapas, mantenidas en medio G-MEM (Invitrogen), con 10% de suero fetal bovino.

3.2. Diseño de *primers*

Los *primers* fueron diseñados utilizando la aplicación de análisis de oligonucleótidos del programa *Vector NTI Suite*. En todos los casos se verificaron las propiedades fisicoquímicas, así como la posibilidad de formación de homodímeros y de estructuras de hairpins.

La lista completa de *primers* utilizados en este trabajo se muestra en el **Anexo I**.

3.3. Precipitación de ADN con Etanol

A la solución de ADN a precipitar se le agregó una décima parte de su volumen de Acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, mezclando por inversión. Se incubó a -20 °C por 20 min y luego se realizó una centrifugación a 12.000 rpm por 30 min. Se lavó el *pellet* con etanol 70% y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió el ADN en un volumen apropiado de agua destilada.

3.4. Extracción de ARN con TRIzol.

La extracción de ARN con el reactivo TRIzol® (Invitrogen) se realizó agregando 3 volúmenes de este reactivo por cada volumen de sobrenadante de cultivo o de la solución que contuviera el ARN de interés. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se agregaron 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado. Luego de mezclar por inversión, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 20 min a 12.000 rpm a 4 °C. Posteriormente se trasvasó la fase acuosa a un nuevo tubo y se agregan 0,7 volúmenes de isopropanol por cada ml de TRIzol utilizado. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 15 min, luego de lo cual se centrifugó por 30 min a 12.000 rpm a 4 °C. El *pellet* se lavó con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendió el ARN en 20 µl de agua libre de ARNasas.

3.5. Retrotranscripción con GoScript™ Reverse Transcription System (Promega)

Se siguieron las indicaciones del fabricante del kit (Promega) para sintetizar ADNc. Brevemente, se mezclaron 1 µg de ARN, 0,5µg de *random primers* o 20 pmoles de *primer* específico, se completó hasta llegar a 5 µl totales con agua libre de ARNasa. Se incubó esta mezcla a 70°C por 5 min, y luego se incubó en hielo hasta su uso.

La mezcla de retrotranscripción contenía los siguientes componentes: *Buffer* de reacción GoScript™ 5X 4µl, MgCl₂ (concentración final 1,5 mM) 1,2µl (25mM), RNasin® 20 unidades, GoScript™ Transcriptasa reversa 1,0µl, en un volumen final de 15µl con agua libre de ARNasas. Se combinaron los dos tubos para obtener una reacción de 20µl totales y se homogeneizó con micropipeta. Se incubó a 25 °C por 5 min, y a 42 °C por 30 min. Por último se inactivó la enzima a 70 °C por 15 min. El ADNc sintetizado puede ser utilizado para la reacción de PCR o congelado a -20 °C para su futuro uso.

3.6. Reacción de PCR con la enzima Pfx50.

Se utilizó la enzima Pfx50 (Invitrogen) porque es una polimerasa de alta fidelidad con una tasa de mutación 50 veces menor que la Taq polimerasa común, cuenta con actividad de hot start que reduce la amplificación inespecífica durante la reacción, y posee una procesividad de 1Kb cada 15 segundos.

Las concentraciones de cada componente en una reacción típica fueron las siguientes: *buffer* de reacción Pfx50™ PCR Mix 1X, dNTP 0,3 mM de cada uno, *primers* 0,3 µM de cada

uno, MgSO₄ 1.2 mM, Pfx50™ DNA Polymerase 5 unidades (por cada 50µl de volumen total de reacción). La cantidad de templado usado fue variable: para una RT-PCR se utilizó de 3 a 5 µl del producto de una retrotranscripción de 20 µl de volumen total; y 1 a 100 pg para ADN plasmídico. Un protocolo de ciclado típico de las PCRs realizadas se ejemplifica a continuación: Desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; 35 ciclos de: desnaturalización a 94 °C, 20 segundos; *annealing* a 2 °C por debajo de la temperatura de *annealing* del *primer* con T_m más baja, 20 segundos; extensión a 68 °C, 1 min por cada kilobase: extensión final a 68 °C por 10 min.

3.7. Reacción de PCR con la enzima GoTaq Polimerasa (Promega)

Por la tasa de error que posee, esta enzima fue usada en los casos en los que el producto de la PCR no estaba destinado a ser clonado posteriormente, como por ejemplo en *screenings* o detección de ARN viral en muestras.

Las concentraciones de cada componente en una reacción típica con esta enzima son las siguientes: *buffer* de reacción GoTaq *Reaction Buffer* 1X, dNTP 0,2 mM de cada uno, *primers* 0,3 µM de cada uno, MgCl₂ 1,5 mM, GoTaq Polymerase 1,25 unidades (por cada 50 µl de volumen total de reacción). Un ciclado típico de las PCRs realizadas se ejemplifica a continuación:

Desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; 35 ciclos de: desnaturalización a 94 °C, 30 segundos; *annealing* a 5 °C por debajo de la temperatura de *annealing* del *primer* con T_m más baja, 30 segundos; extensión a 72 °C, 1 min por cada kilobase del producto de PCR, más 1,5 min adicionales; extensión final: 72 °C por 10 min.

3.8. Digestión con enzimas de restricción (ERs).

Para las digestiones de los diferentes ADNs y plásmidos se utilizaron entre 200 ng y 2 µg de ADN (dependiendo de si el objetivo era realizar un *screening* o una preparación de ADN para clonado), se utilizaron aproximadamente 5 U de ER de restricción (New England Biolabs, Fermentas o Promega) por cada 500 ng de ADN a cortar. Se adicionó un décimo del volumen total de reacción del *buffer* de reacción 10X provisto por el fabricante y se completó el volumen total de reacción con agua destilada (de 20 a 100 µl totales dependiendo de la cantidad de ADN utilizado). Las reacciones se incubaron de 3 a 8 hs, a la temperatura indicada por el fabricante de la ER. Por último se inactivó la ER por incubación a 70 °C por 20 min.

3.9. Electroforesis en geles de agarosa

Las concentraciones de agarosa utilizadas en los geles fueron entre 0,7% - 2%. Dichos geles se prepararon y se corrieron en *buffer* TBE 0,5X (45 mM Tris-base, 45mM ácido bórico, 1 mM EDTA) a 5-10 V/cm. Para visualizar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Al momento de sembrar, las muestras se mezclaron con *buffer* de siembra 6X (50% glicerol, 2% azul de bromofenol). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron 100 bp DNA *Ladder*, Lambda HindIII y Lambda EcoRI HindIII (Productos BioLógicos). La documentación de los geles se realizó con el equipo *MultiDoc-it Imaging System* (UVP).

3.10. Extracción y purificación de ADN de geles de agarosa.

Para este procedimiento se utilizó el kit QIAEX II (Quiagen). Se cortó la banda de ADN de interés del gel con una hoja de bisturí, se pesó y mezcló con tres volúmenes de *buffer* QX1. Se resuspendió la solución de sílica y se agregó al tubo con el gel 15 µl de la misma, se incubó a 50°C por 10', con agitación periódica. Se centrifugó y lavó el *pellet* en *buffer* QX1 y dos veces en *buffer* PE. El *pellet* se dejó secar a temperatura ambiente por 10' y se incubó en 20 µl de agua destilada o *buffer* Tris-HCl 10 mM (pH 8.5) a 50 °C por 10'. Luego de centrifugar 1' a 10000 rpm, el sobrenadante con el ADN se guardó a -20 °C hasta su uso.

3.11. Tratamiento de ADN con fosfatasa alcalina (defosforilación de los extremos 5' fosfato)

La remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos utilizados en los clonados se llevó a cabo utilizando 5 U de la enzima fosfatasa alcalina (CIP, New England Biolabs) y un décimo del volumen total del *buffer* de reacción 10X, agregados junto a una parte del ADN digerido en un volumen total de 30 µl. La reacción se incubó por 30 min a 37 °C. Para inactivar esta enzima se adicionaron 0,2 volúmenes de EDTA 100mM e incubó la reacción a 65 °C por 15 min.

3.12. Adición de adenosinas a extremos romos (*A-tailing*)

Este procedimiento produce el agregado de adenosinas en los extremos 3' de los productos de PCR amplificados con la enzima Platinum® Pfx ADN polimerasa (Invitrogen), para

poder clonarlos en el vector pGEMT-Easy (Promega). Para esto se incubaron los productos de PCR, ya purificados, en presencia de 1,25 U de la enzima GoTaq polimerasa (Promega) en su *buffer* de reacción 1X y 0,3 mM dATP durante 30 min a 50 °C.

3.13. Ligación de moléculas de ADN

Para el ligado de los insertos con los vectores correspondientes a cada caso particular se utilizaron entre 20 y 100 ng de vector, y relaciones molares inserto/vector variables según el caso. Por lo general se utilizaron proporciones entre 1,5:1 y 3:1. En todos los casos se incluyó un control de vector sin inserto, el cual se denominó “control de religado”. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl, en presencia de *buffer* de ligado (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM dATP, 25 µg/ml seroalbúmina bovina) y 5 U de enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs). La reacción se incubó durante la noche (típicamente 15hs) a 16 °C.

3.14. Análisis por PCR de las colonias bacterianas (“*toothpick assay*”)

Este ensayo se utilizó para identificar posibles colonias recombinantes después de una reacción de ligación. Para este ensayo se incluyó como control negativo una colonia obtenida en la placa correspondiente al control de religado, o una alícuota del plásmido sin cortar sometida al mismo tratamiento que las colonias analizadas. La metodología utilizada se detalla a continuación.

Se numeraron las colonias a analizar en el reverso de la placa de Petri. Se levantaron una a una las colonias de la placa con un escarbadietes estéril y se resuspendieron en *cracking buffer* (50 mM NaOH, SDS 0,5%, 5 mM EDTA, glicerol 20% y azul de bromofenol 0,5 %) en tubos rotulados. Los que se incubaron a 70 °C por 25 min. Una vez finalizada la incubación se dejaron reposar los tubos a temperatura ambiente 5 min, luego se centrifugaron 30 segundos a 12.000 rpm y se sembraron en un gel de agarosa al 0.7%, hasta separar las bandas correspondientes al ARN y al ADN plasmídico súper-enrollado.

En estos geles se observaron bandas correspondientes al ARN, al ADN genómico y a las tres conformaciones del ADN plasmídico, pero solo sirven para el análisis de las colonias las bandas correspondiente a la conformación super-enrollada del plásmido. Las colonias que posean un retraso, con respecto al control negativo, en la migración del ADN plasmídico en conformación super- enrollada serán las que posiblemente hayan incorporado el inserto.

3.15 Bacterias y medios de cultivo

Las bacterias competentes utilizadas fueron:

- DH5 α genotipo: *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.
- DH10 β genotipo: F⁻ *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 endA1 recA1 deoR Δ (ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ* .

Los cultivos bacterianos, en suspensión o en placas de agar, fueron realizados en medio Luria-Bertani (LB).

El medio LB se compone de: extracto de levadura 5g/L, NaCl 10 g/L y bacto- triptona 10 g/l. En el caso de LB-agar se utilizó una concentración de agar de 2% p/v. Los antibióticos se utilizaron en las siguientes concentraciones: ampicilina 50 μ g/ml, kanamicina 50 μ g/ml, según se describe en cada caso.

3.16. Transformación de bacterias competentes.

La inducción de competencia se realizó con el método descrito por Inoue y cols. (1990).

Se descongeló un vial de bacterias competentes sobre hielo. A cada tubo de bacterias se agregaron 2 μ l del producto de la reacción de ligado o 0,2 μ l de ADN en forma superenrollada, dependiendo del caso. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 25 min. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42 °C por 45 segundos y se volvió a incubar en hielo por 2 min. Para la recuperación de las bacterias se agregaron 600 μ l de medio LB, se incubó 45 min a 37 °C con agitación suave y se plaqueó en medio LB-agar conteniendo el antibiótico apropiado para cada caso. Por último las placas se incubaron a 37 °C durante la noche.

3.17. Minipreparaciones de ADN

Para estas preparaciones se partió de 3 ml de cultivo de bacterias en medio LB con el antibiótico apropiado, crecidas durante la noche a 37 °C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 12.000 rpm y se resuspendieron en 200 μ l de Solución P1 (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) con 5 μ g de Ribonucleasa A (Fermentas) por tubo. Luego, se agregaron 200 μ l

de Solución P2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) y se mezcló por inversión lentamente. Finalmente se agregaron 200 µl de Solución P3 fría (3 M acetato de potasio) y se mezcló por inversión hasta que se observó la formación de un precipitado blanco. Se incubó en hielo durante 15 min y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se realizó una extracción con 400 µl de cloroformo, mediante agitación en vortex de la mezcla y una posterior centrifugación a 12.000 rpm por 15 min. Una vez separadas las fases se trasvasó la fase acuosa a un nuevo tubo, se agregaron 0,7 volúmenes de isopropanol, se incubó 20 min a -20 °C y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min. El precipitado se lavó con etanol 70% y, una vez seco, se resuspendió en 35 µl de agua destilada.

3.18. Maxi-preparaciones de ADN con columna.

Para obtener grandes cantidades de ADN de alto nivel de pureza se utilizó el kit Qiagen tip500. En la primer parte de este procedimiento, se utilizaron las mismas soluciones (P1, P2 y P3) que para realizar una mini-preparación de ADN.

Se cultivaron 300 ml de bacterias en medio LB, adicionado del antibiótico adecuado en un erlenmeyer de 1l, en agitación a 37 °C toda la noche. Una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, el cultivo se centrifugó a 6000rpm por 15 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de bacterias fue resuspendido en 10 ml de solución P1 con ARNasa. Se agregaron 10 ml de solución P2, mezclando cuidadosamente por inversión, e incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se adicionaron 10 ml de solución P3 frío, se mezcló suavemente por inversión, se incubó en hielo por 20 min, y se centrifugó a 6.000 rpm, a 4 °C por 30 min.

Durante la centrifugación, se equilibró la columna Qiagen-tip 500 con 10 ml de *Buffer* QBT. Se agregó a la columna el sobrenadante de la lisis de las bacterias y luego se lavó dos veces la columna con 30 ml de *buffer* QC. El ADN se eluyó con 10 ml de *Buffer* QF y se recolectó el eluido en un tubo Corex de 30 ml. Se precipitó el ADN con 7 ml de isopropanol y centrifugó a 12.000 rpm por 45 min a 4 °C. Se lavó el *pellet* con 5 ml etanol 70% y dejó secar a temperatura ambiente por 10 min y finalmente, se resuspendió en 300 µl de agua destilada.

Composición de los *buffer* del kit “Qiagen-tip 500”:

Buffer QBT: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v); 0.15% Triton® X-100 (v/v)

Buffer QC: 1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)

Buffer QF: 1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)

3.19. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN fue realizada por el servicio de Macrogen Inc. (Corea del Sur). Los ADNs se enviaron purificados.

Los alineamientos de secuencias de ADN se realizaron con la aplicación *AlignX* del software *Vector NTI Suite*. Para reconstruir secuencia por solapamiento de los extremos de secuencias de menor tamaño se utilizó la aplicación *Contig Express* del mismo programa.

3.20. Purificación de ARN con el kit SV Total RNA Isolation System (Promega)

El kit fue utilizado siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el protocolo es el siguiente:

Agregar 175µl RNA *Lysis Buffer* (RLA) para un máximo de 30mg de tejido celular y mezclar enérgicamente. Agregar 350µl de RNA *Dilution Buffer* (RDA). Mezclar por inversión.

Adicionar 200 µl de etanol absoluto y mezclar con micropipeta. Trasvasar la mezcla a la columna y centrifugar a 12000 rpm por 1 min. Descartar el eluido. Agregar 600µl de RNA *Wash Solution* (RWA) centrifugar 1 min a 12.000 rpm, descartar el eluido. Mezclar aparte 40 µl de *Yellow Core Buffer*, 5 µl MnCl₂ 0.09M y 5 µl de DNasa I por cada tubo a tratar. Mezclar por pipeteo y colocar 50 µl de esta mezcla en cada columna y dejar incubando a temperatura ambiente por 15 min.

Añadir 200 µl de *DNase Stop Solution* (DSA) y centrifugar 1 min a 12.000 rpm.

Agregar 600 µl de RWA y centrifugar por 1 min a 12.000 rpm. Descartar el eluido. Realizar un segundo lavado con 250 µl de RWA y centrifugar a 12.000 rpm por 2 min. Colocar la columna en un tubo *ependorf* estéril, y añadir a la columna 50 µl de agua libre de ARNASas. Centrifugar 1 min a 12.000 rpm y guardar el eluido que contiene el ARN a -70 °C hasta su uso.

3.21. Electroforesis de ARN en condiciones desnaturizantes.

La electroforesis de ARN en condiciones desnaturizantes se realizó en un gel 1X TBE (89mM Tris base, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA), 8 M urea y 0,8% de agarosa.

Se mezclaron 3 μ l del marcador de tamaño molecular de ARN simple cadena y 2 μ l de la reacción de transcripción *in vitro* con 7 μ l del *buffer* desnaturizante (del kit MAXIscript) GLB II (95% formamida, 0,025% xilencianol, 0,025% azul de bromofenol, 18 mM EDTA y 0,025% de SDS). Se incubaron las muestras a 95°C por 2 min. Seguidamente se sembraron en el gel y se realizó la electroforesis a 5V/cm.

3.22. Transcripción *in vitro* con T7 polimerasa.

Se digirieron de 5 a 10 μ g de ADN plasmídico de la construcción que se deseaba transcribir con la ER EcoRV. Para asegurar la digestión total de los ADNs las reacciones se incubaron por un período de 5 hs y se confirmó la digestión mediante una electroforesis en un gel de agarosa 0,7%. Se inactivó la ER a 65 °C por 20 segundos. Se agregó 3M acetato de sodio (1/10 del volumen total de reacción) y se precipitó el ADN digerido con etanol absoluto. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en agua libre de ARNasas.

La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el kit MAXIscript® T7 (Ambion) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó 1 μ g del templado de ADN. Se incubaron las reacciones durante 5 h a una temperatura de 37 °C. Una vez cumplido el tiempo de incubación se realizó un tratamiento con ADNasa (TURBO DNase I) de 15 min a 37 °C. El ARN sintetizado fue purificado con el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega). Se confirmó la integridad del ARN mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes en un gel de agarosa 1%.

3.23. Células

Para este trabajo se utilizaron células BHK-21 clon 13. La propagación de las células se hizo en medio de cultivo G-MEM (Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Internegocios), 50 μ g/ml de streptomicina y suplementado hasta 580 mg/l de glutamina, incubadas a 37 °C, en atmósfera de 5% de CO₂.

3.24. Transfección de células

Las transfecciones de ARN o ADN se realizaron en monocapas de células BHK-21 en un nivel de confluencia de entre el 80 y el 90 %. Dependiendo del caso, se utilizó Lipofectamina

(Invitrogen) o DMRIE-C (Invitrogen). Los volúmenes y cantidades especificados más adelante, son para placas de 6 pocillos.

3.24.1. Transfecciones de ARN con DMRIE-C.

Se lavaron las monocapas celulares con 2 ml de medio Opti-MEM (Invitrogen) libre de suero a temperatura ambiente. En un tubo de poliestireno se añadieron 1,0 ml de medio Opti-MEM, y 12 μ l del reactivo DMRIE-C y se mezcló suavemente por inversión a temperatura ambiente. Luego se agregaron 3 μ g del ARN a transfectar y se mezcló por inversión nuevamente. Seguidamente se reemplazó el medio de cultivo de las células por el medio con ARN y DMRIE-C. (Para las transfecciones con ARN no se realizó una incubación previa para la formación de complejos). Luego de una incubación de 5 hs a 37 °C se reemplazó el medio de cultivo con medio G-MEM con 2 % de suero fetal bovino. Se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Una vez cumplido el tiempo necesario las monocapas se congelaron y descongelaron 3 veces, se clarificó el medio de cultivo mediante centrifugación durante 10 min a 3.000 rpm y se conservaron a -80 °C.

Como control negativo de transfección se realizó el mismo procedimiento descrito pero en ausencia de ARN. En los casos en que se transfectó con el clon de ADN completo (o el ARN derivado del mismo) para generar virus infeccioso, se utilizó suero fetal bovino proveniente de Nueva Zelanda (Hyclone) para evitar la presencia de anticuerpos neutralizantes para VFA en el medio de cultivo.

3.24.2. Transfección de ARN con Lipofectamina

Se lavaron las monocapas celulares con 2 ml de medio Opti-MEM libre de suero a temperatura ambiente. En un tubo se añadió 0,1 ml de medio Opti-MEM y 10 μ l del reactivo Lipofectamina y se mezclaron suavemente por inversión a temperatura ambiente.

En otro tubo se mezclaron 0,1 ml de Opti-MEM y 3 μ g del ARN a transfectar. Ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez completada la incubación se diluyó la mezcla agregando 0,1 ml de Opti-MEM. A continuación se reemplazó el medio de cultivo de las células por el medio con la mezcla ARN+ Lipofectamina, y completaron los pocillos con 0,2ml adicionales de Opti-MEM (volumen total de transfección 0,4 ml). Luego

de una incubación de 5 hs a 37 °C se reemplazó el medio de cultivo con medio G-MEM con 2 % de suero fetal bovino. Se incubó nuevamente a 37 °C en una atmosfera de 5% de CO₂.

3.24.3. Transfección de ADN con Lipofectamina

La transfección de ADN con lipofectamina se realizó de la misma forma que la de ARN, utilizando 2 µg de ADN por cada pocillo a transfectar, en una placa de 6 pocillos.

3.25. Mutagénesis dirigida.

La metodología utilizada para la mutagénesis dirigida es la publicada en Papworth y cols. (1996) levemente modificada, que es la utilizada en distintos *kits* comerciales (Stratagene). Se diseñaron dos *primers* complementarios entre sí que poseen la mutación que se desea producir. Se procuró que la temperatura de *melting* de estos *primers* fuera de entre 75 y 80°C. Se realizó la PCR con la enzima Pfx50 (Invitrogen) sobre un plásmido cerrado que posee la secuencia a modificar. Dado que este procedimiento no produce un aumento exponencial del producto buscado (como una PCR convencional) sino que produce un aumento geométrico, la cantidad de templado utilizado para la reacción debe ser alta (entre 150 y 200 ng por reacción). Posteriormente se realizó una electroforesis preparativa en gel de agarosa 0,8% con el producto de PCR y se purificó la banda que corresponde a un ADN lineal del tamaño total del plásmido. Luego se digirió una alícuota de este ADN purificado con la ER DpnI (Fermentas) durante 1 h y finalmente se transformaron bacterias competentes con el producto de esta restricción. Las colonias obtenidas fueron secuenciadas para encontrar aquellas en que se produjo exitosamente la mutagénesis.

3.26. Mutagénesis por *overlap extension* PCR (OE-PCR).

Distintas variantes de esta técnica se detallan en Higuchi y cols. (1988), Liang y cols. (1995) y Urban y cols. (1997). A continuación se describe brevemente la metodología empleada. Se diseñaron un par de *primers* (sentido y antisentido) que poseen la modificación deseada, y que tienen al menos 15 bases de complementariedad entre ellos en sus extremos 5'. Estos *primers* se utilizaron junto a *primers* externos en PCRs por separado para obtener dos amplicones, los cuales comparten un segmento idéntico, donde se encuentra la modificación deseada, en uno de sus extremos. Ambos amplicones se purificaron por medio de una electroforesis preparativa y extracción de gel de agarosa, para eliminar los *primers* y productos de PCR inespecíficos. A continuación se fusionaron ambos amplicones mediante con un

protocolo similar al de la PCR, pero sin *primers*, con un ciclado estándar, teniendo en cuenta la temperatura de *melting* del extremo que poseen en común, y el tiempo de elongación necesario para un amplicón del tamaño que se quiere generar. Al cabo de los 35 ciclos del programa la mayor parte de los amplicones se han fusionado. Si por alguna razón las cantidades obtenidas de la fusión son demasiado bajas el segmento fusionado puede amplificarse usando los *primers* externos de la primera etapa en una PCR. Finalmente se purifica el ADN con una electroforesis preparativa para su clonado.

3.27. Cuantificación de ARN por PCR en tiempo real.

3.27.1. Puesta a punto de la reacción

Como primer paso se diseñaron diferentes pares de *primers* para Real-time PCR con el programa *Primer premier 3.0*. Dado que dicho programa no tiene en cuenta parámetros necesarios para la realización de la qPCR con el sistema de SYBR *Green*, se tuvo que someter a los pares de *primers* diseñados por el programa a una selección que tuviera en cuenta los requerimientos de este sistema en particular (que difieren en ciertos aspectos a los requerimientos para el sistema TaqMan, para el cual está diseñado el programa *Primer premier 3.0*).

Con este fin se analizaron los siguientes parámetros de cada par de *primers*:

- Tamaño de amplicón mayor a 80 pb y menor a 200 pb.
- Análisis de complementariedad entre *primers* para reducir la probabilidad de la formación de heterodímeros.
- Análisis de autocomplementariedad de cada *primer* para reducir la probabilidad de la formación de homodímeros.

De la selección realizada se obtuvieron 2 pares de *primers*, a los que hubo que realizarles leves modificaciones para reducir la posible formación de dímeros.

Al realizar una PCR convencional con dichos pares de *primers*, utilizando un ADN como templado, uno de ellos generó un producto de PCR del tamaño esperado y el segundo par no produjo amplificación alguna. Se repitió esta PCR con distintas cantidades de templado sin ningún efecto, por lo tanto se decidió abandonar el trabajo con este último par de *primers*.

Para continuar con la puesta a punto se eligió el par de *primers* F5200 (TGGCAATGTTTCAATACGACTGT) y Real-Rev5298 (CTCGACCCGATCAATCACCT), que produce el

amplicón más grande (110 pb), ya que tendrá una temperatura de *melting* superior y por lo tanto será más fácil diferenciarlo (en la curva de disociación) de los dímeros de *primer* que puedan formarse.

Al realizar la primera prueba de qPCR con este par de *primers* y diferentes cantidades de templado se observó que, a medida que la cantidad de templado disminuye aumenta la formación de dímeros de *primers*. También se observó formación de dímeros de *primers* en los controles negativos (sin templado), lo que produce una fluorescencia similar en magnitud a la obtenida para las muestras con templado más diluídas.

Con el fin de solucionar este problema se realizó una matriz de *primers* para evaluar cuales son las concentraciones mínimas de cada *primer* que pueden ser utilizadas sin disminuir notoriamente la eficiencia de la PCR, pero que minimicen la formación de dímeros de *primer*.

Se trabajó con una matriz como la ejemplificada en la Tabla 3.27.1, realizando las reacciones por duplicado, una de ellas con una cantidad fija de templado en todos los casos y otra sin templado.

Tabla 3.27.1. Matriz de *primers* para RT PCR en tiempo real.

Concentraciones finales de cada uno de los *primers* para cada tubo que compone la matriz.

		<i>Primer Real-for5200 (Forward)</i>		
		50 nM	150 nM	250 nM
<i>Primer Real-Rev5298 (Reverse)</i>	50 nM	<i>Primer forward: 50 nM</i> <i>Primer reverse: 50 nM</i>	<i>Primer forward: 150 nM</i> <i>Primer reverse: 50 nM</i>	<i>Primer forward: 250 nM</i> <i>Primer reverse: 50 nM</i>
	150 nM	<i>Primer forward: 50 nM</i> <i>Primer reverse: 150 nM</i>	<i>Primer forward: 150 nM</i> <i>Primer reverse: 150 nM</i>	<i>Primer forward: 250 nM</i> <i>Primer reverse: 150 nM</i>
	250 nM	<i>Primer forward: 50 nM</i> <i>Primer reverse: 250 nM</i>	<i>Primer forward: 150 nM</i> <i>Primer reverse: 250 nM</i>	<i>Primer forward: 250 nM</i> <i>Primer reverse: 250 nM</i>

Una vez realizada la qPCR se analizaron tres puntos en particular en cada combinación para decidir la concentración de *primers* a utilizar. La combinación a elegir es la que cumpla con:

- Mínima formación de *primers* en el control sin templado.
- Mantenga un Ct lo más cercano posible al de la combinación con las concentraciones más altas de *primers* (lo cual se refleja en la parte exponencial de la amplificación).
- Llegue a un *plateau* en la amplificación lo más cercano posible al de la combinación con las concentraciones de *primers* más altas.

En la Fig. 3.27.1 se muestran a modo de ejemplo sólo 4 de las combinaciones de *primers*, ya que en ellas se pueden ver claramente las diferencias en los criterios utilizados para elegir las concentraciones de cada uno a utilizar en el futuro. En dicha figura puede verse como en la fase exponencial de la reacción los tratamientos 250nM /250nM y 150nM /250nM de *primer* (forward y reverse respectivamente) se superponen, para finalmente alcanzar cantidades totales de producto acumulado diferentes.

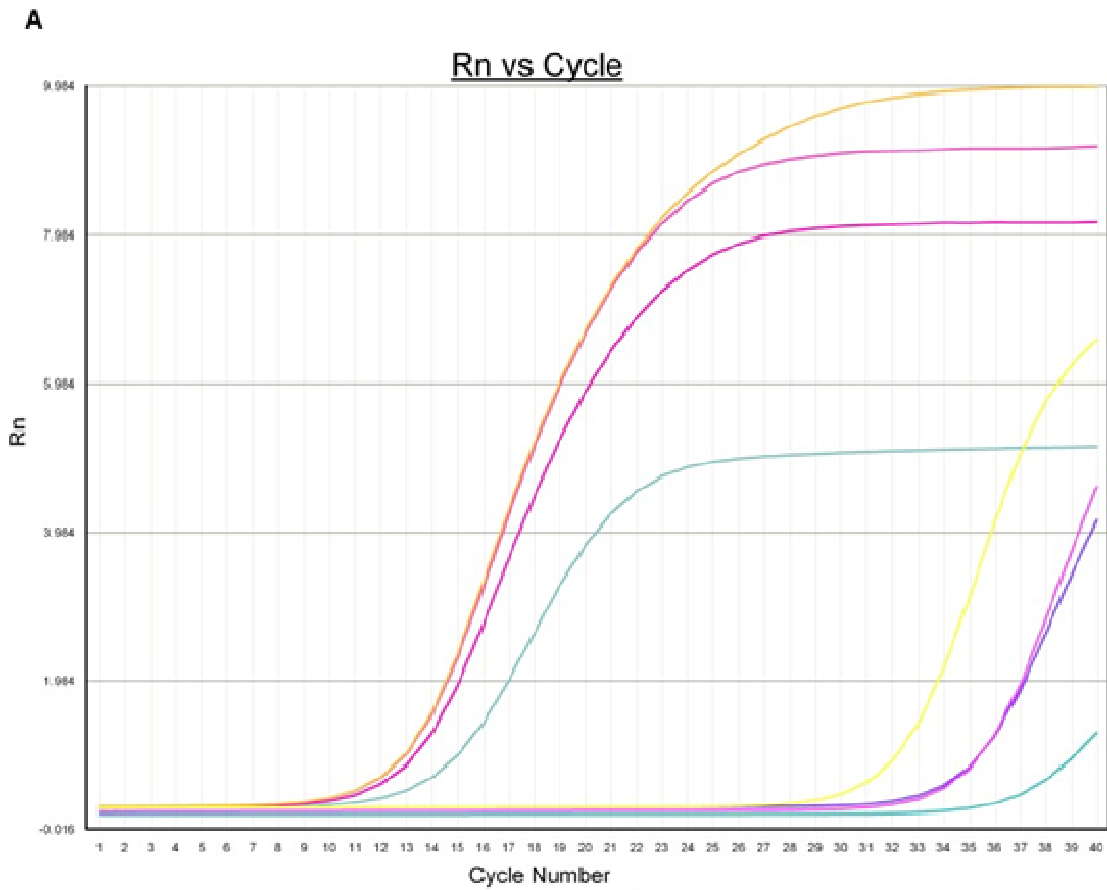


Figura 3.27.1. Real-time PCR con una matriz de *primers* para la optimización de las condiciones con el sistema SYBR Green. A) Gráfico de fluorescencia normalizada versus ciclos de amplificación. Las curvas, de izquierda a derecha, corresponden a los tratamientos; 250nM/250nM , 150nM/250nM, 150nM/50nM y 50nM/50nM de los *primers forward* y *reverse*, respectivamente, en presencia de templado. Los tratamientos de las reacciones sin templado se presentan el mismo orden pero sobre los ciclos finales.

B

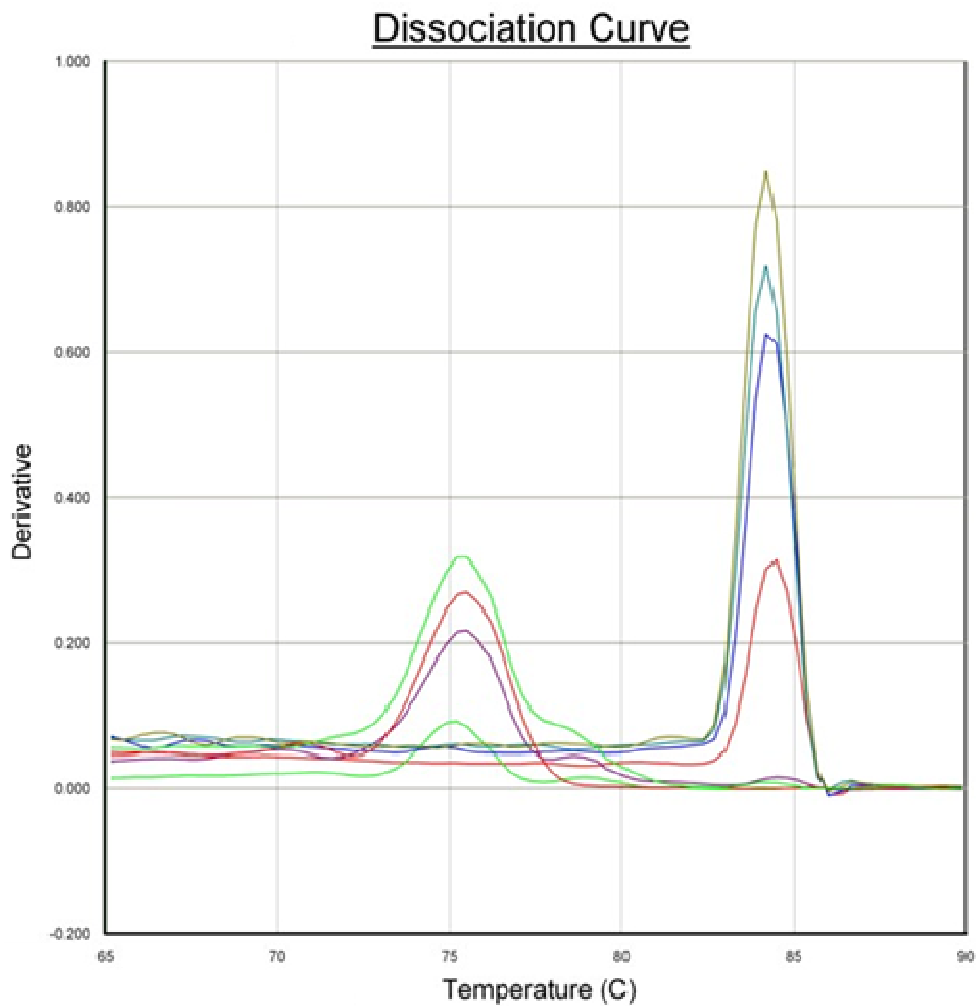


Figura 3.27.1. B) Curva de disociación. Este gráfico es la derivada de la gráfica de fluorescencia normalizada versus temperatura. Los picos observados indican la temperatura de *melting* de los ADNs presentes (temperatura a la cual el 50% de un dado amplicón se encuentra en forma de doble cadena). Esto permite visualizar si en algún tratamiento ha habido amplificación inespecífica y/o dimerización de *primers*. El pico de 84,2 °C corresponde al amplicón específico, el de 75,5 °C a los dímeros de *primers*

Asimismo se observa que los tratamientos 150nM /150nM y 50nM /50nM poseen pendientes menores en la fase exponencial, se hace visible la amplificación a ciclos más tardíos y alcanzan una cantidad de producto acumulado muy menor a las anteriores. Los tratamientos sin templado muestran que la acumulación de dímeros de *primers* más alta sucede en el tratamiento 250nM /250nM, con cantidades de dímeros prácticamente iguales en los tratamientos 150nM/250nM y 150nM /150nM y con un mínimo en el tratamiento 50nM /50nM.

Dado que la combinación que mejor cumple con los requerimientos comentados anteriormente es la correspondiente a las concentraciones 150 nM para el *primer forward* y

250 nM para el *reverse*, esta será la utilizada para poner a punto la técnica y evaluar la eficiencia de nuestra qPCR.

Dado que para que la PCR sea cuantitativa debe tener una eficiencia lo más cercana al 100% posible (en el rango de concentraciones de templado en que se harán las determinaciones) es necesario realizar una curva estándar con diferentes concentraciones de templado. Esto permitirá evaluar el rango de concentraciones en que se mantiene la linealidad (rango en que se mantiene la eficiencia máxima para el par de *primers* utilizados).

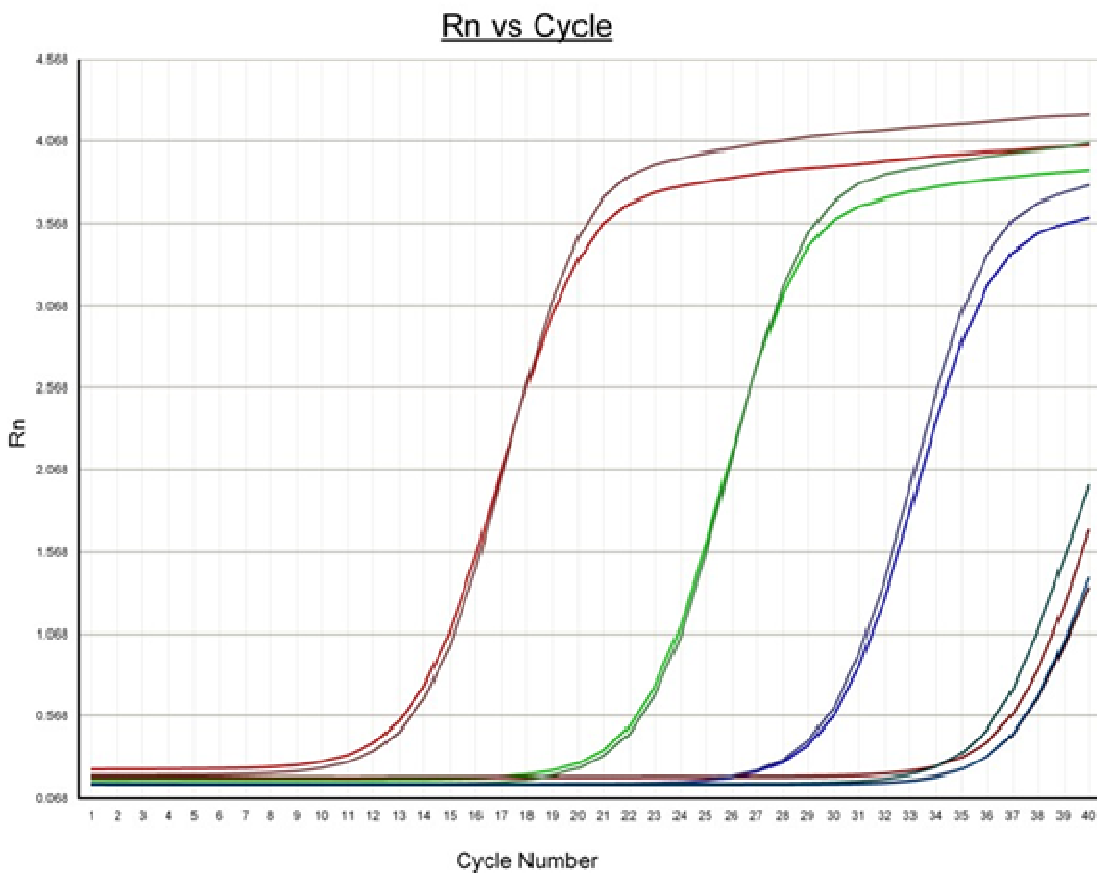


Figura 3.27.2 Gráfico de fluorescencia normalizada versus número de ciclos para la curva estándar. Cada dilución del estándar se hizo por duplicado al igual que el control sin templado. La dilución de $1 \cdot 10^{-6}$ muestra mayor variación entre réplicas que las diluciones menores y que los controles sin templado. Dichas réplicas poseen una diferencia con respecto al control sin templado de 1 y 2 Ct.

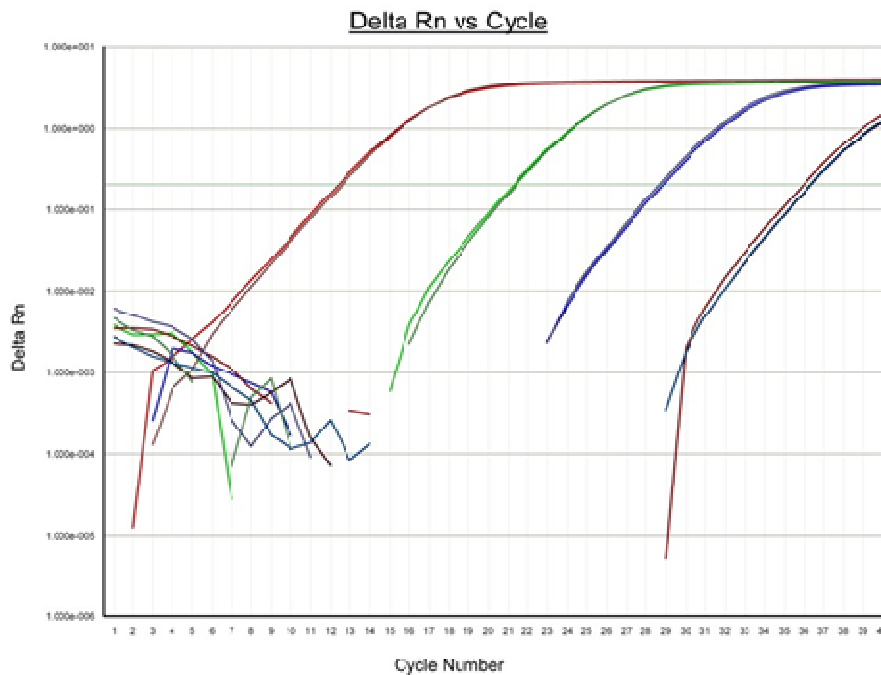
Como templado se utilizaron diluciones seriadas del ADN del clon completo. Para ello se cuantificó dicho ADN por espectrofotometría y luego partiendo de 0,5 μg de dicho ADN se realizó una dilución inicial de 1 en 1000 y de la misma diluciones seriadas de 1 en 100.

Inicialmente las curvas estándar no resultaron reproducibles: la eficiencia calculada variaba ampliamente entre distintas repeticiones, mostraban una gran dispersión entre los datos, y el ajuste de los datos a la función no era bueno. Esta suma de factores indicaba que, al menos parte del problema radicaba en un error en las cantidades del templado que se agregaron a cada reacción. A raíz de lo cual se comenzó a realizar las diluciones utilizando volúmenes considerablemente más grandes y utilizando las pipetas automáticas que tuvieran la fecha de calibración más reciente.

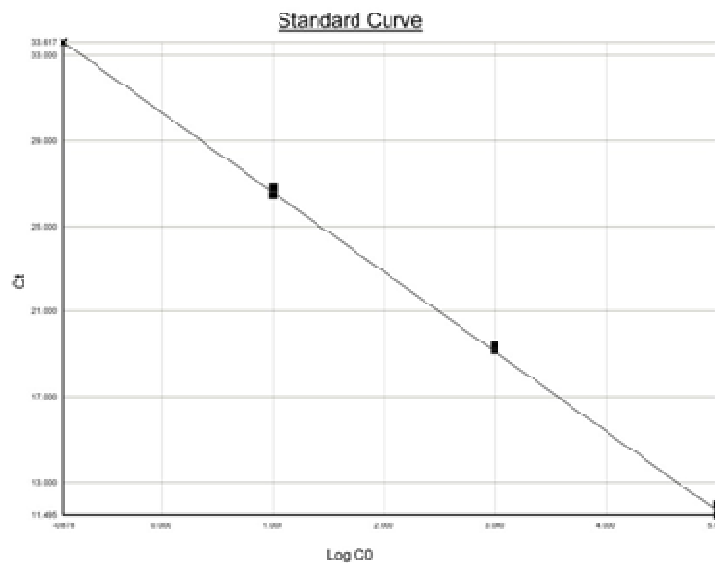
Una vez hecho esto se redujo notablemente la variación entre los duplicados y se obtuvo un rango de diluciones en los que se mantuvo la linealidad de manera reproducible. Un ejemplo de estas curvas estándar puede verse en la Fig. 3.27.2.

Al analizar los datos de la curva estándar puede verse que mantiene la linealidad durante 4 log de las concentraciones (Fig. 3.27.3A). Los datos del ajuste lineal (Ct en función del log de la concentración) informados en el gráfico se hicieron dejando fuera del análisis a la dilución de $1 \cdot 10^{-6}$ (Fig. 3.27.3B). También puede observarse que la formación de dímeros de *primers* sigue produciéndose, y que los Ct obtenidos para los controles sin templado son muy cercanos a los obtenidos para la dilución $1 \cdot 10^{-6}$ (solo 1 Ct de diferencia). En esta última dilución puede verse en la curva de disociación, que sigue habiendo formación de dímeros de *primers* (Fig. 3.27.4), y por lo tanto incluirá un error generado por la imposibilidad de diferenciar qué porcentaje de la fluorescencia observada proviene del amplicón. Adicionalmente debe tenerse en cuenta que la eficiencia de la PCR pueda ser disminuida por esta formación de dímeros de *primers*.

A



B



Slope: -3.736737, Intercept: 30.335987, R2: 0.998891

Figura 3.27.3 Análisis de los datos obtenidos de la curva estándar (A) Gráfica de fluorescencia total normalizada a la cual le fue sustraída la línea de base (a esto se lo denomina Delta Rn) versus ciclos. En este gráfico puede apreciarse la fase exponencial de la reacción más fácilmente. El valor de umbral y línea de base fueron asignados por el programa de análisis automáticamente. **(B)** Curva estándar propiamente dicha, regresión lineal de valores de Ct como función del logaritmo de las concentraciones. Para el análisis de los datos se omitieron los correspondientes a la dilución de $1 \cdot 10^{-6}$, por detectarse dímeros de *primers* a dicha dilución.

Dado que deseamos tener un ensayo que nos permita medir la replicación de genomas virales necesitamos poder realizar determinaciones en un amplio rango de concentraciones del templado. Otro dato importante es lograr obtener un ensayo en el cual se pueda obtener

una amplificación específica (en la cual no se observe una formación de dímeros de primer significativa) en el punto de la curva de calibración correspondiente a la mayor dilución.

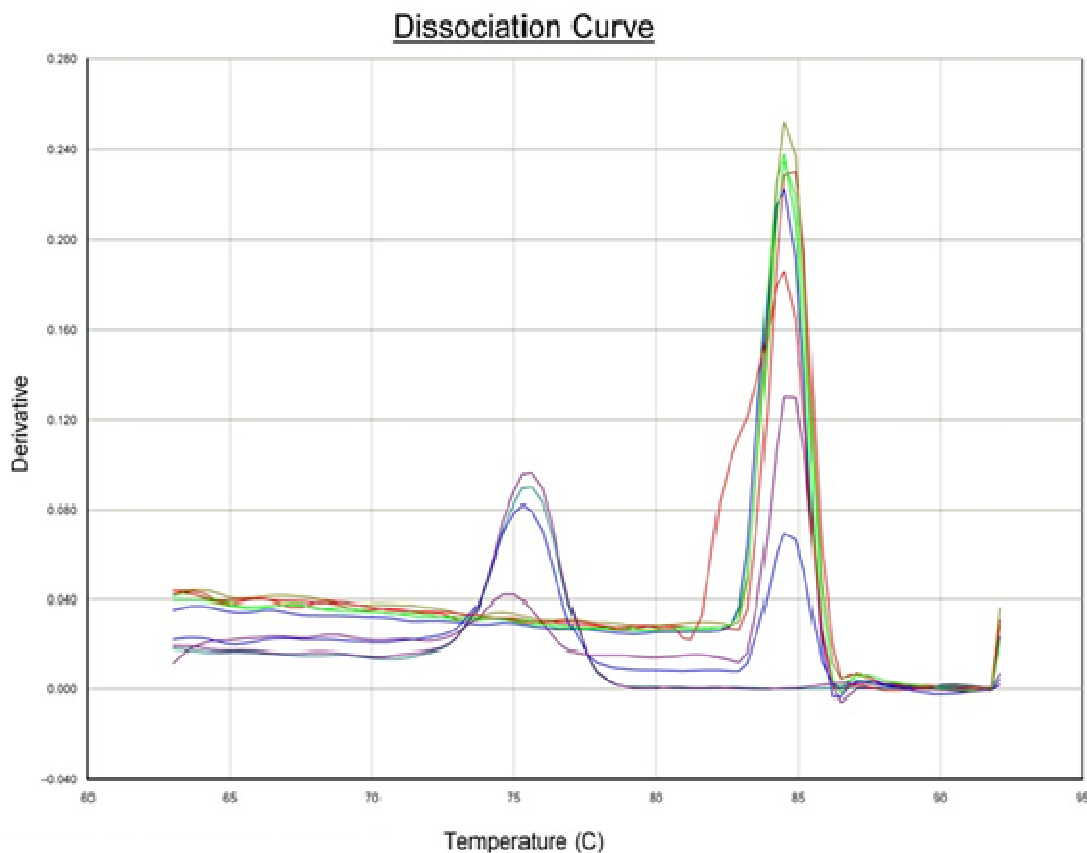


Figura 3.27.4 Curva de disociación. En esta curva puede apreciarse como uno de los tratamientos (las dos réplicas correspondientes a la dilución de $1 \cdot 10^{-6}$) posee dos picos. Esto se debe a la formación de dímeros y amplificación específica en el mismo tubo.

Por lo tanto, al utilizarse esta técnica en muestras que posean una concentración de templado similar a la correspondiente al punto de la curva de calibración de la dilución $1 \cdot 10^{-6}$, deberá repetirse el ensayo utilizando una dilución menor de la muestra (o un volumen mayor de la misma). De esta forma se podrá cuantificar dichas muestras utilizando diluciones de las mismas que entren dentro del rango dinámico del ensayo.

El equipo utilizado para la realización de la qPCR fue *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) y el *Master Mix* fue *5x FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)* (Solis BioDyne).

El ciclado utilizado fue:

- Activación inicial de la enzima: 15 min a 94 °C (recomendado por el fabricante del *Master Mix*).

- Desnaturalización del templado: 20 segundos a 94 °C.
- *Annealing* y elongación de amplicones: 1 min a 60 °C.

Se realizaron 40 ciclos de desnaturalización y elongación. La medición de fluorescencia se realizó durante el minuto de *annealing* y elongación, tal como lo indica el manual del equipo *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems).

3.27.2. Normalización con el gen endógeno GAPDH

Para la normalización se utilizará el gen endógeno GAPDH. Para ello se diseñaron los *primers* utilizando la secuencia de un EST de *Mesocricetus auratus* (*golden hamster*), roedor del cual se produjo la línea celular BHK-21. Para ello dicho EST (nro. de acceso en base de datos DQ403055.1) se alineó con secuencias de ARN de GAPDH de distintos roedores (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Cricetulus griseus* y *Sigmodon hispidus* entre otros) y se diseñaron *primers* en las zonas conservadas. De los distintos pares de *primers* generados el que demostró ser el más indicado para qPCR (por especificidad y tamaño de amplicón) fue el par GDH85-105F (GGCACAGTCAAGGCTGAGAAC) y GDH196-177R (CATACTCGGCACCAGCATCA). Dicho par de *primers* produce un amplicón de 111 pb, y la matriz de *primers* realizada para este par indicó que la concentración óptima es de 150 mM de cada uno de ellos. Las curvas estándar realizadas con estos *primers* mostraron una buena eficiencia de la PCR y un rango dinámico mayor al obtenido para VFA.

3.28. Inmunofluorescencia indirecta.

Se crecieron células de la línea BHK-21 sobre cubreobjetos en placas multiwell de 12 pocillos hasta alcanzar la confluencia deseada para realizar las transfecciones correspondientes.

Una vez listas para realizar la inmunofluorescencia se siguió el siguiente protocolo:

- Se retiró el medio de cultivo con pipeta y se lo reemplazó con una solución de paraformaldehído al 2% y Triton X100 al 0,1%, previamente enfriado (4°C), dejándolo incubar por 30 min en hielo.
- Se realizaron dos lavados con PBS a 4 °C (de 5 min de incubación cada uno).
- Se realizó la incubación con el anticuerpo primario (diluido en PBS) por periodo de 1 h a 4 °C.

- Se realizaron 4 lavados con PBS a 4 °C (de 5 min de incubación cada uno).
- Se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (diluido en PBS) por periodo de 1 h a 4 °C.
- Se realizaron 4 lavados con PBS a 4 °C (de 5 min de incubación cada uno).
- Se retiró el exceso de *buffer* del cubreobjeto apoyando un borde del mismo sobre papel absorbente (sin dejar secar la superficie).
- Se montó el cubreobjetos (con las células hacia abajo) sobre un portaobjeto utilizando el producto FluorSave™ *Reagent* (Calbiochem) entre ambos, ejerciendo presión sobre el cubreobjetos para desplazar el exceso de FluorSave™ entre ambos vidrios.
- Se mantuvo el preparado por 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente para que el producto FluorSave™ solidifique.
- Por último se observaron los preparados en un microscopio de fluorescencia *Eclipse E600* (Nikon) en el mismo día que realizado el preparado.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anticuerpo monoclonal anti 3A (IgG de ratón), ya descrito en la publicación Seki y cols. (2009).
- Antisero anti 3C preparado en ratón en el CEVAN.
- Anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón, conjugado al fluoróforo Alexa 594: Anti mouse Alexafluor® 594, Life Colors (Invitrogen).

PBS (pH 7.4):

137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄.

3.29. Ensayos de actividad de luciferasa.

Los ensayos de actividad de luciferasa como gen reportero se realizaron utilizando el kit "*Luciferase Assay System*" (Promega). Las células para los ensayos de luciferasa fueron sembradas en placas multiwell de 12 pocillos por lo que los volúmenes detallados corresponden a dicho formato.

El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante, el cual se detalla a continuación.

Lisis de células:

- Se retiró el medio de cultivo con pipeta y se realizó un lavado con 200 μ l de PBS a temperatura ambiente.
- Se removió el PBS del lavado con pipeta y se agregó 80 μ l de CCLR X1 (*Buffer* de lisis) a temperatura ambiente.
- Se despegaron completamente las células de la monocapa utilizando la pipeta.
- Se trasvasó el lisado a un tubo *eppendorf* de 1,5 ml que se mantuvo en hielo por 10 min.
- Se agitó el tubo con el lisado en un Vortex por 15 segundos y se centrifugó a 4 °C y 12.000 rpm por 2 min.
- Se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo *eppendorf* y se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

Medición de actividad:

- Se programó el luminómetro (BioTek FLX800) para la lectura según las recomendaciones del fabricante.
- Se descongelaron las muestras y se las dejó estabilizar a temperatura ambiente, al igual que el LAR (*Luciferase assay reagent*).
- Se colocaron alícuotas de 20 μ l de los extractos celulares en una placa opaca específica para la medición de la actividad de luciferasa (LIA plate, 96 wells, White, flat bottom Greiner Bio One). Se mantuvo la placa envuelta en papel aluminio para protegerla de la luz.
- Una vez colocadas las muestras se agregaron 100 μ l de LAR a cada pocillo mezclando suavemente por pipeteo (siempre cambiando de tips entre muestra y muestra) cuidando de no generar burbujas.
- Se colocó la placa *multiwell* en el luminómetro y se efectuó la lectura.
- Las mediciones se realizaron en tandas de no más de 15 muestras por vez, para evitar que los tiempos de espera afecten las lecturas de los últimos pocillos de la medición.
- Los datos resultantes de la medición fueron almacenados en plantillas de *Excel*[®].

3.30. Modelado de proteínas.

Para la realización de los modelados moleculares inicialmente se realizó un alineamiento de las secuencias proteicas a modelar con las secuencias existentes de VFA en la base de datos de proteína cristalizadas (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). En cada caso se seleccionó para el modelado la que posee el mayor grado de homología. El punto de corte requerido para realizar los modelados fue de un 60% de homología entre las secuencias, dicho punto de corte es un requerimiento del *software* utilizado. Igualmente en los casos incluidos en esta tesis la homología entre las secuencias fue ampliamente superior al punto de corte. Una vez identificada la proteína con el mayor grado de homología se obtuvo la información cristalográfica de la misma, y se realizó el modelado de las mismas. Tanto la determinación de la molécula templado más adecuada, como el modelado se realizaron con los programas integrados en la plataforma SWISS-MODEL Workspace (Guex y cols., 1997; Schwede y cols., 2003 y Arnold y cols., 2006).

Una vez obtenida la proteína modelada, analizó con el software QMEAN (Benkert y cols., 2011) el grado de confiabilidad que posee el modelado obtenido.

El software QMEAN realiza un análisis de distintos parámetros para determinar el ajuste de la secuencia a la estructura de la proteína modelada, analizando geometría local, ángulos de enlaces peptídicos en grupos de tres aa, solvatación, y potenciales de interacción dependientes de la distancias entre átomos (entre otros parámetros). De esta forma el valor de QMEAN4 informado por el programa indica la calidad del ajuste que posee la estructura obtenida. Un ajuste adecuado posee valores de QMEAN4 en el rango de 0-1. Adicionalmente el programa calcula otro parámetro denominado QMEAN *Z-score*, el mismo evalúa distintos parámetros de la estructura modelada y los compara con los obtenidos de un alto número de estructuras obtenidas por cristalografías de alta resolución. Mayores valores de QMEAN *Z-score* indican una mayor concordancia con características termodinámicas de estructuras reales, lo que se relaciona con la estabilidad del plegamiento y la interacción con el solvente. Asimismo, este valor se ve afectado si se analizan individualmente cadenas proteicas que forman parte de un oligómero, ya que las superficies de interacción entre proteínas poseen características diferentes a las que están expuestas al solvente. Valores de QMEAN *Z-score* en el rango de -1 a 1 indican que la estructura obtenida del modelado posee un alto nivel de confiabilidad.

Tanto los alineamientos mencionados, como los valores de los parámetros obtenidos con el programa QMEAN se presentan en el Anexo IV.

4. RESULTADOS

4.1. PARTE I

Objetivo: Construcción de una copia del genoma completo de la cepa del VFA O1/Campos y clonado de la misma en un plásmido, río abajo del promotor de la polimerasa T7.

4.1.1 Diseño de la estrategia de construcción de la copia del genoma completo de la cepa del VFA O1/Campos.

El diseño del plásmido para generar un clon infeccioso correspondiente a la secuencia de la cepa O1/Campos del VFA fue realizado de forma tal de no introducir mutaciones en la secuencia genómica de VFA O1/Campos para su construcción, o bien mantenerlas al mínimo posible. De esta forma, las mutaciones que se encuentren en la secuencia del clon de genoma completo serán las presentes en la población de ARN virales (cuasiespecies) a partir de las que se realizaron las reacciones de RT-PCR, o bien aquellas mutaciones introducidas durante el proceso por la ADN polimerasa ARN dependiente utilizada para la retrotranscripción o (en menor medida) por la ADN polimerasa ADN dependiente (con actividad *proofreading*) utilizada para la amplificación por PCR de los distintos segmentos.

Con este fin se realizó un diseño en el cual se utilizaron para los diferentes clonados y sub-clonados sitios de corte para enzimas de restricción (ER) presentes en la secuencia genómica publicada de O1/Campos. Para la introducción del tracto de poli citosinas [poli(C)] se utilizó una estrategia que permite insertar el mismo sin introducir cambios en las zonas circundantes.

Para generar ARNs simil genómicos por medio de transcripción *in vitro* la secuencia genómica de VFA se ubicó río abajo de un promotor para la polimerasa del bacteriófago T7, sistema que es ampliamente utilizado para la generación de ARNs *in vitro*. Para el mejor funcionamiento del sistema se incluyeron dos guanosinas adicionales entre el sitio de inicio de la transcripción de la polimerasa T7 y el de la secuencia viral, ya que se ha descrito que esto aumenta la tasa de inicios de la transcripción (Milligan y cols., 1987). Por otra parte, para linealizar el templado de la transcripción *in vitro* se utiliza la ER EcoRV que, al no poseer sitios de corte dentro de la secuencia genómica viral, linealizará el templado inmediatamente después de la cola de poli(A) 3' terminal del genoma del VFA, adicionando únicamente 3 nucleótidos (G, A y T) en el extremo.

La ER EcoRV genera extremos romos, por lo que se evitarán los inconvenientes descriptos cuando se transcriben con polimerasa T7 ADNs linealizados con ERs que generan extremos cohesivos con 3' "overhangs" (Schenborn y cols., 1985).

El esquema general se muestra en la Fig. 4.1.1

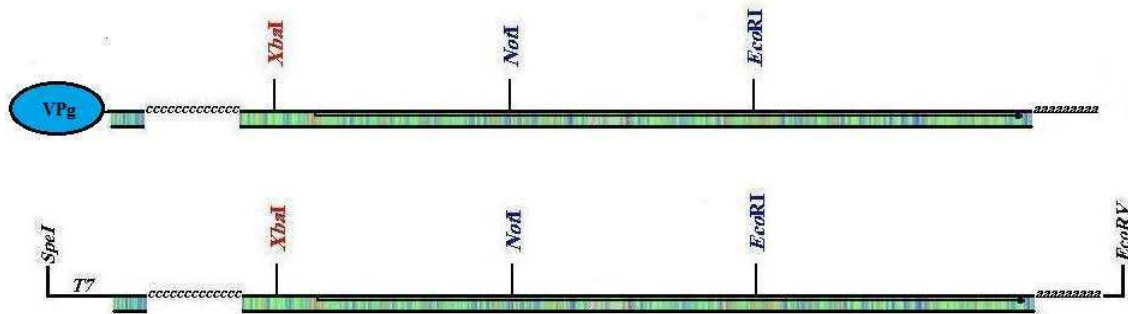


Figura 4.1.1. Esquema general de la construcción. Se muestran los sitios de restricción únicos a utilizar.

4.1.2. Amplificación del genoma.

La amplificación por RT-PCR del genoma se realizó en 4 segmentos, esquematizados en la Fig. 4.1.2

- El segmento **S** abarca el extremo 5' del genoma desde su comienzo hasta el poli(C), y posee un promotor T7 río arriba del comienzo de la secuencia viral, separada de la misma por dos guanosinas. En el extremo 3' del segmento **S**, se introdujo una secuencia sintética diseñada para la introducción del tracto de poli(C).
- El segmento **L1** abarca desde el fin del tracto de poli(C) hasta el sitio de corte con la ER NotI, que se encuentra dentro de la zona que codifica para la proteína VP1. En el extremo 5' de L1 se introdujo otra secuencia sintética diseñada para la posterior inserción del poli(C), complementando la ya introducida en el segmento **S**.
- El segmento **L2** abarca desde el sitio de corte para la ER NotI hasta el sitio de corte para la ER EcoRI, localizado en la secuencia codificante para la proteína no estructural 3A.
- El segmento **L3** abarca desde el sitio de corte para EcoRI hasta el final del genoma, el cual finaliza con un tracto de poli(A) de 20 nucleótidos, seguido de un sitio de corte para la ER EcoRV, con el cual se planea linealizar el ADNc para su transcripción *in vitro*.

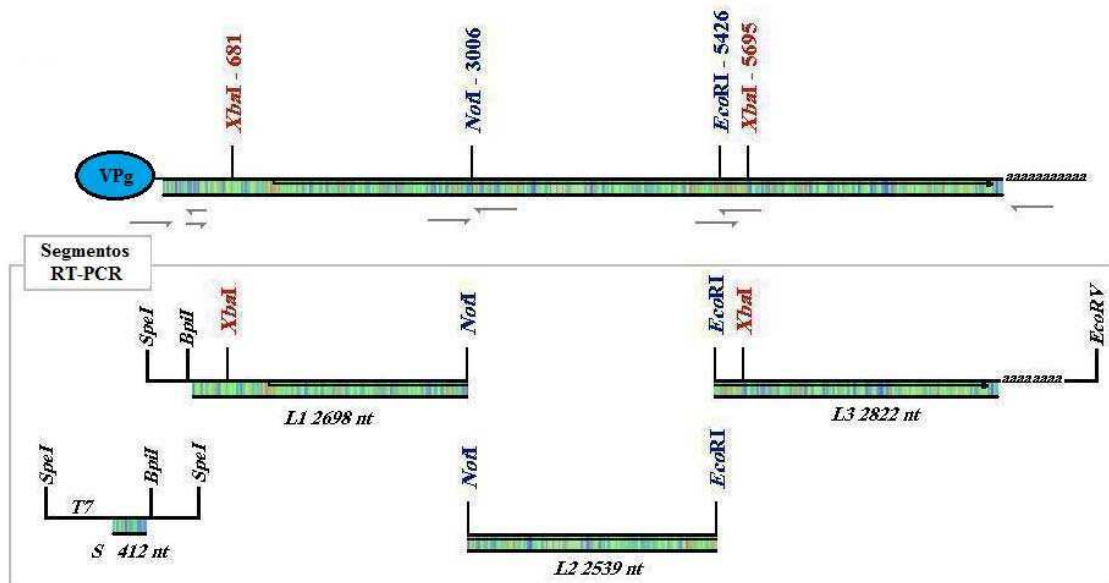


Figura 4.1.2. Esquema de amplificación del genoma de la cepa O1/Campos en 4 segmentos. Se indican los tamaños en nucleótidos de **S**, **L1**, **L2** y **L3**, los sitios de restricción y la ubicación de los primers.

4.1.3. Diseño del ensamblado del genoma completo e inclusión del tracto de poli(C).

A grandes rasgos, una vez obtenidos los distintos segmentos que conforman la totalidad del genoma de VFA O1/Campos se ensamblaron por un lado los segmentos **S** y **L1** que componen la mitad 5', excluyendo el tracto de poli(C) y por otro los segmentos **L2** y **L3**, que componen la mitad 3' del genoma.

Para incluir el tracto de poli(C), se subclonó posteriormente un segmento acotado (**S**) del tramo **S-L1**, (Fig. 4.1.2.), que incluye desde el extremo 5' hasta el primer sitio de corte para la ER XbaI. En esta porción separada se realiza la inserción del poli(C) y posteriormente se reconstruye la mitad 5' que ahora incluirá el tracto de poli(C).

Finalmente se unieron las dos mitades del genoma.

4.2. Obtención del genoma del VFA en 4 fragmentos de copias de ADN de doble cadena.

Para la amplificación del genoma del VFA se utilizó como templado ARN de la cepa O1/Campos, obtenido del laboratorio NBS 3Agricultura (4 OIE) de SENASA. El mismo se amplificó en cuatro segmentos (S, L1, L2 y L3) a través de reacciones de retrotranscripción utilizando el sistema GoScript Reverse Transcription System y el *primer* reverso indicado en cada caso. Una lista completa de los *primers* utilizados se provee en el Anexo I. Un esquema del procedimiento puede verse en la Fig. 4.1.1, mientras que los productos de las reacciones de RT-PCR para cada segmento puede verse en la Fig. 4.2.1, que resume el resultado de las distintas reacciones en las que se obtuvieron los 4 segmentos con copias genómicas en ADN (ADNc).

4.2.1. Amplificación del segmento S.

El segmento denominado S comprende el extremo 5' del genoma de VFA desde su inicio hasta el comienzo del tracto de poli(C), que en el caso del aislamiento O1/Campos abarca 367 nucleótidos. La reacción de retrotranscripción se realizó utilizando el *primer* S-rev que es complementario a la zona comprendida entre los nucleótidos 349-367 y posee una secuencia sintética diseñada para la introducción del poli(C) en su extremo 5'. Posteriormente se realizó una reacción de PCR, usando los *primers* S-T7-For y S-rev, para así amplificar un segmento de 412 pares de bases (pb).

Dicho ADNc fue sometido a una reacción de "A-tailing" con Taq polimerasa, purificado a partir de una electroforesis preparativa en gel de agarosa al 2%, y posteriormente clonado en el plásmido pGEMT-Easy. Una vez identificadas las colonias candidatas por medio del "toothpick assay" se verificó la presencia del fragmento S digiriendo los ADNs con la ER SpeI (Fig. 4.2.2). Finalmente se secuenció la construcción para confirmar su identidad.

El ADNc obtenido posee en ambos extremos sitios de corte para la ER SpeI. En el extremo 5' posee la secuencia promotora de la polimerasa T7 (promotor T7), la cual se encuentra separada de la secuencia viral por dos guanosinas. En el extremo 3' posee una secuencia sintética que contiene un sitio de reconocimiento para la ER Bpil (Fig. 4.2.3A), la cual por su ubicación, al digerir el ADN deja como extremo cohesivo los últimos cuatro nucleótidos previos al tracto de poli(C). La decisión del número de guanosinas a utilizar entre el promotor T7 y la secuencia viral se tomó en base a los resultados obtenidos por Liu y cols. (2004). En la Fig. 4.2.3B se puede observar la secuencia del fragmento S en la zona correspondiente al promotor T7 y el comienzo de la secuencia genómica del VFA.

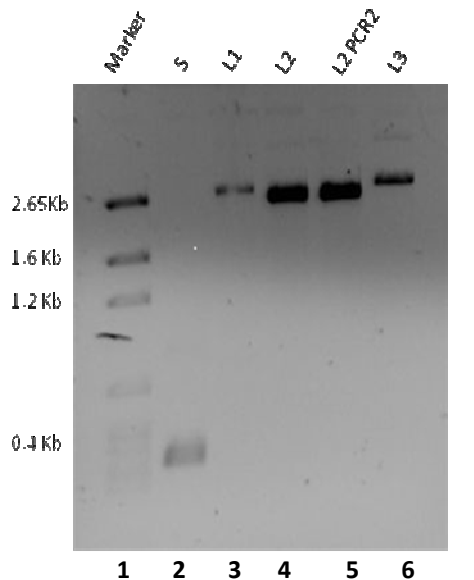


Figura 4.2.1. Fragmentos genómicos amplificados por PCR. Calle 1: marcador de PM; calles 4 y 5 muestran amplificaciones independientes del fragmento L2.

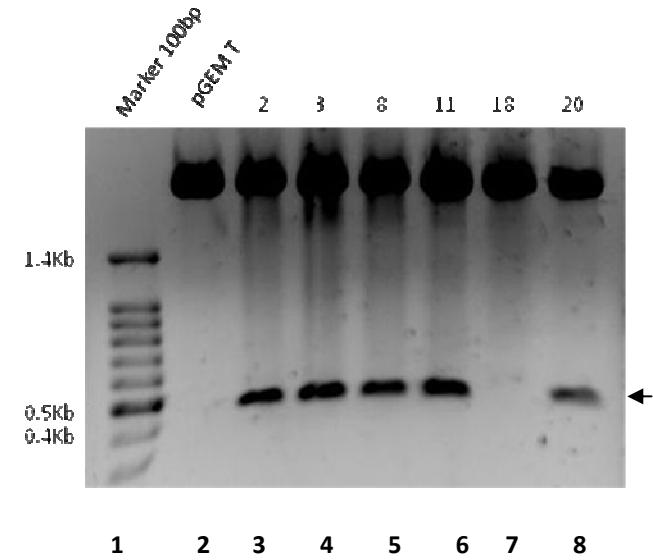


Figura 4.2.2. Restricción con SpeI de amplificaciones del segmento S clonado en p-GEM-T. Calle 1: marcador de PM. Calle 2: vector vacío. Calles 3-8: clones analizados. La flecha indica el segmento S.

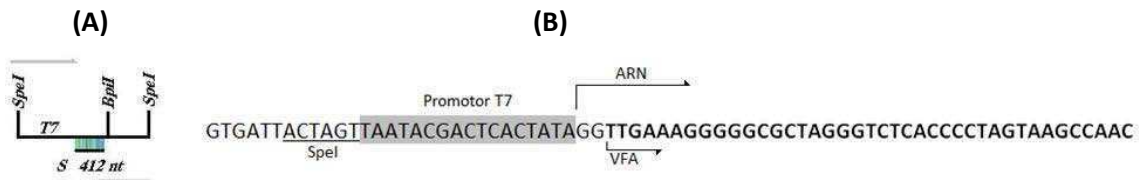


Figura 4.2.3. Esquema del fragmento 5' de la construcción. (A) Esquema del segmento S mostrando los sitios de restricción agregados para su clonado. (B) Secuencia del fragmento S en la zona correspondiente al promotor T7 y al comienzo de la secuencia genómica del VFA.

4.2.2. Amplificación del segmento segmento L1.

El segmento L1 comprende desde los primeros nucleótidos de la secuencia viral río abajo del poli(C) hasta el sitio único para la ER NotI, que está ubicado en la zona que codifica para la proteína VP1 (posición 3006 de la secuencia genómica de O1/Campos). La retrotranscripción se realizó utilizando el *primer* L1r, con la secuencia complementaria a los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 3027-3050. El producto de dicha reacción se amplificó por PCR con el *primer* L1r y el *primer* L1-For, que representa los primeros 19 nucleótidos de la secuencia viral río abajo del poli(C) (nucleótidos 368-387), más una secuencia sintética que incorpora sitios de corte para las ERs BpI y SpeI en el extremo 5', los que servirán para la adición del poli(C) y para su clonado, respectivamente (Fig. 4.2.4A).

Como resultado de esta PCR se obtuvo un amplicón del tamaño esperado para el segmento L1 (2668 pb). Luego de una electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1% y una reacción de "A-tailing", fue clonado en el vector pGEMT-Easy. De las colonias obtenidas se realizaron *minipreps* de ADN y se identificaron aquellas que poseían el inserto a través de cortes con las ERs *SpeI* y *NotI* (Fig. 4.2.4B). Por último los ADNc se secuenciaron para verificar la identidad de los insertos.

De esta manera el segmento L1 clonado en pGEMT-Easy queda conformado (de 5' a 3') por una secuencia sintética que posee sitios de corte para las ERs *SpeI* y *BpII* seguido por la secuencia genómica del VFA O1/Campos comprendida entre los nucleótidos 368-3050, e incluye el sitio de corte para la ER *NotI* (posición 3006 de la secuencia genómica viral).

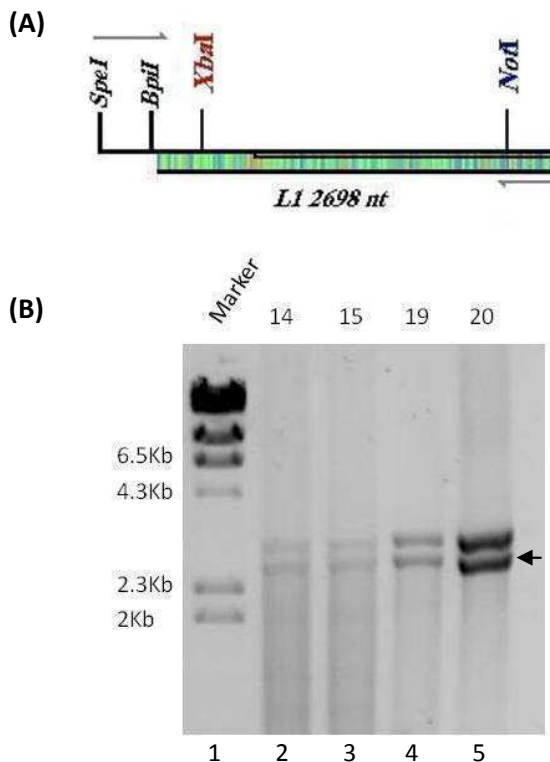
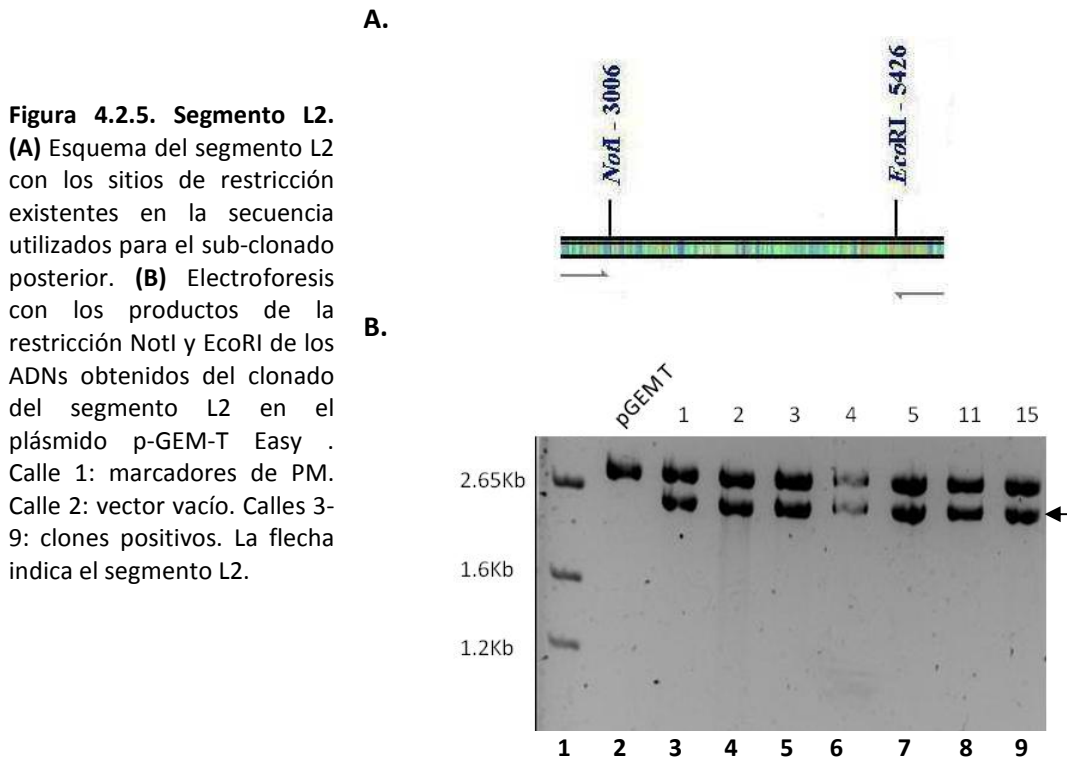


Figura 4.2.4. Segmento L1. (A) Esquema del segmento L1 y los sitios de corte de ERs agregados en uno de sus extremos. (B) Productos de corte con las ERs *SpeI* y *NotI* de los ADNs obtenidos del clonado del segmento L1 en el plásmido p-GEM-T Easy. Calle 1: marcadores de PM. Calles 2-5: clones positivos. La flecha indica el segmento L1.

4.2.3. Amplificación del segmento segmento L2.

El segmento L2 abarca desde la posición 2943 a la 5482 de la secuencia del VFA O1/Campos. Los sitios de corte para las ERs que se utilizaron para ensamblarlo con el resto de los segmentos son los de *NotI* (posición 3006) y *EcoRI* (posición 5426). Para este segmento se realizó la retrotranscripción utilizando el *primer* L2r que es complementario a la secuencia viral entre las posiciones 5456-5482, y el producto de dicha reacción se utilizó como templado para realizar una PCR con los *primers* L2r y L2f (que posee la secuencia desde el nucleótido 2943 al 2967) (Fig. 4.2.5A). Dicha PCR dio como resultado un amplicón de 2539 pb.

Nuevamente se purificó el amplicón a partir de una electroforesis preparativa y se sometió a una reacción de “A-tailing” para proceder a su clonado en pGEM-T Easy. De las colonias obtenidas se realizaron cultivos y posteriores *minipreps* de ADN, se identificaron las colonias que poseían el inserto a través de digestión con las ERs NotI y EcoRI (Fig. 4.2.5B), y finalmente se corroboró la identidad del inserto por secuenciación.

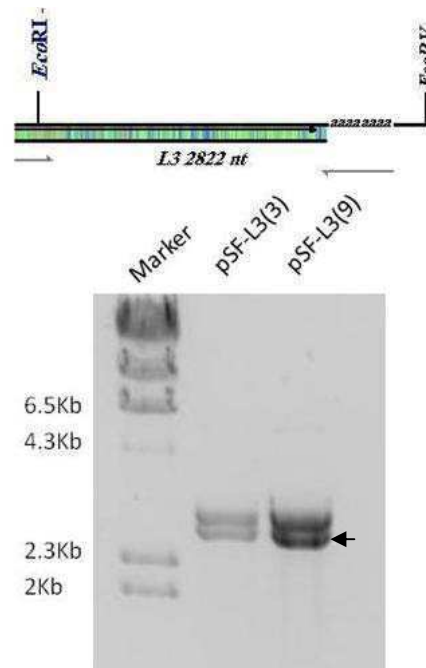


4.2.4. Amplificación del segmento L3.

El segmento L3 abarca desde la posición 5381 hasta la cola de poli(A) de la secuencia de la cepa de VFA O1/Campos. Para su clonado se utilizó el sitio de corte para la ER EcoRI (posición 5426) y un sitio para EcoRV introducido inmediatamente río abajo de una cola de poli(A) de 20 nucleótidos de longitud. Para la retrotranscripción se utilizó un oligonucleótido que posee un tracto de poli(T) de 20 nucleótidos de longitud y un sitio de corte para la ER EcoRV en su extremo 5'. El producto de dicha reacción se utilizó como templado para una reacción de PCR con el *primer* anteriormente mencionado y el *primer* L3-For que posee la secuencia del VFA entre las posiciones 5381-5409, obteniendo como resultado un amplicón de 2822 pb. Un ejemplo de como se encuentra conformado el segmento L3 puede verse en la Fig. 4.2.6A. Dado que el clonado de este segmento en pGEM-T fue dificultoso, se decidió tratar de clonarlo en el plásmido pSFI. Para esto el amplicón y el plásmido pSFI fueron digeridos con las ERs EcoRI y EcoRV y purificados de electroforesis preparativas en geles de agarosa al 1%.

Posteriormente se realizó una reacción de ligación entre ambos, utilizando una relación inserto:vector de 3:1. De las colonias obtenidas se realizaron cultivos y posteriores minipreparaciones de ADN, se identificaron las colonias que poseían el inserto por digestión con las ERs EcoRI y EcoRV (Fig. 4.2.6B), y finalmente se corroboró la identidad de los insertos por secuenciación.

Figura 4.2.6. Segmento L3. (A) Esquema del segmento L3 y sitios de corte para las ERs EcoRI y EcoRV (agregado inmediatamente después de la cola de poli(A) para su linealización. **(B)** Electroforesis de los productos de la restricción EcoRV y EcoRI de los ADNs obtenidos del clonado del segmento L3 en el plásmido pSFI (3054 pb). Calle 1: marcadores de PM. Calle 2-3: clones positivos. La flecha indica el segmento L3.



De esta forma se clonaron los 4 segmentos que en su conjunto conforman la totalidad del genoma de VFA O1/Campos, excluyendo el tracto de poli(C).

4.2.5. Ensamblado del segmento L2-3.

El segmento L2-3 comprende la secuencia genómica desde el sitio de corte para NotI en la posición 3006 hasta la cola de poli(A) 3' terminal. Para unir los dos segmentos conservando los sitios de corte, primero se subclonó el segmento L3 desde pSFI al plásmido pBluescript SKII utilizando las ERs EcoRV y EcoRI, y posteriormente se le adicionó el segmento L2 utilizando las ERs NotI y EcoRI (Fig. 4.2.7).

La razón para realizar el ensamblado de L2-3 en el plásmido pBluescript SKII fue para tener los sitios que permitieran completar en pasos posteriores la unión final de todos los segmentos, ya que el vector final en el cual queda ensamblado el clon completo (pKF4) no

posee sitios de corte para EcoRV y pSF-L3 no posee otro sitio de corte que pueda ser utilizado para tal fin.

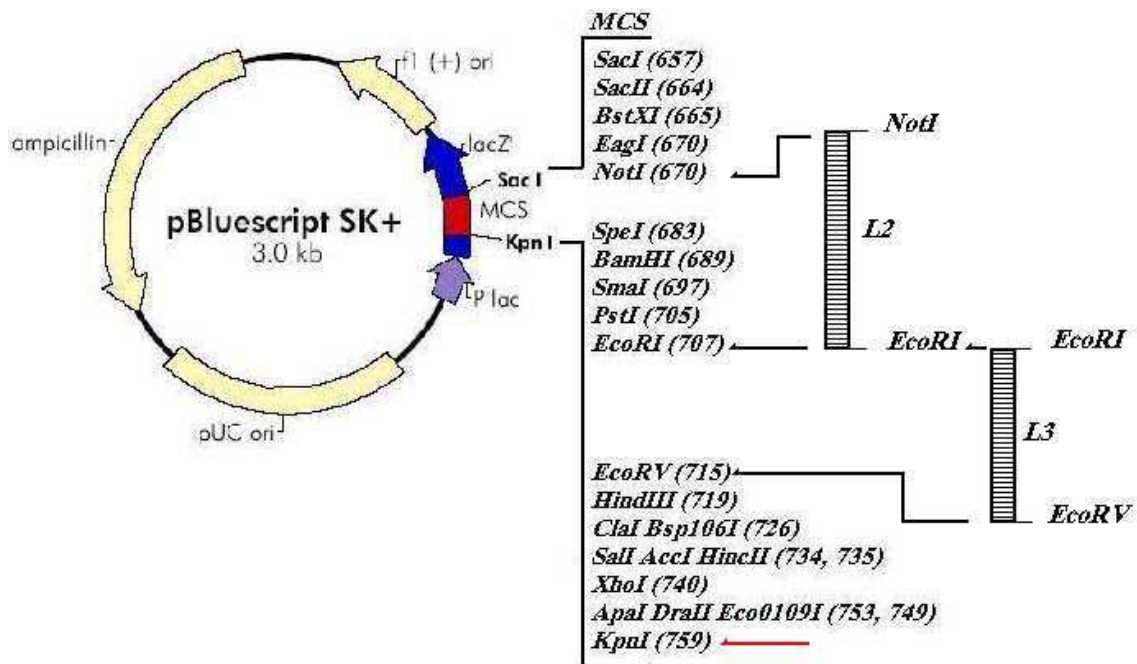
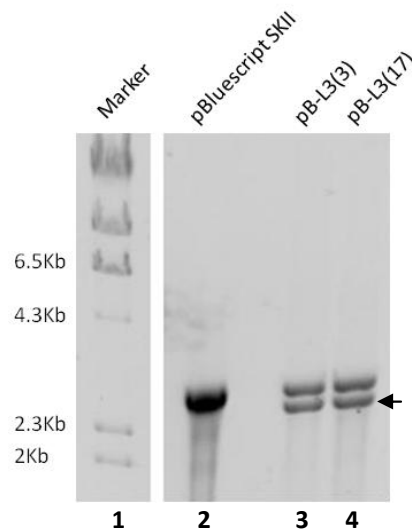


Figura 4.2.7. Esquema del subclonado de los segmentos L2 y L3 en el plásmido pBluescript SKII. Se indica con una flecha el sitio de corte para la ER KpnI, que será utilizado en pasos posteriores de subclonado.

Figura 4.2.8. Subclonado del segmento - L3 en pBluescript SKII. Electroforesis de los productos de restricción del plásmido con las ERs EcoRI y EcoRV . Calle 1: marcadores de PM. Calle 2: plásmido vacío. Calles 3-4: clones positivos. La flecha indica el segmento pB-L3.



Una vez purificados los ADNs, se realizó una reacción de ligación y transformación de bacterias competentes y se identificaron las colonias que incorporaron el inserto por medio de digestión con las ERs EcoRI y EcoRV (Fig. 4.2.8), obteniéndose la construcción pB-L3.

A continuación se subclonó el segmento L2 en pB-L3. Para ello se digirieron los ADNs de pB-L3 y pG-L2 con las ERs NotI y EcoRI y se trató con fosfatasa alcalina la construcción pB-L3

digerida. Se realizó el *screening* para identificar las colonias recombinantes por restricción con las ERs EcoRV y NotI, y adicionalmente con las tres ERs (EcoRI, EcoRV y NotI) (Figs. 4.2.9 A y B).

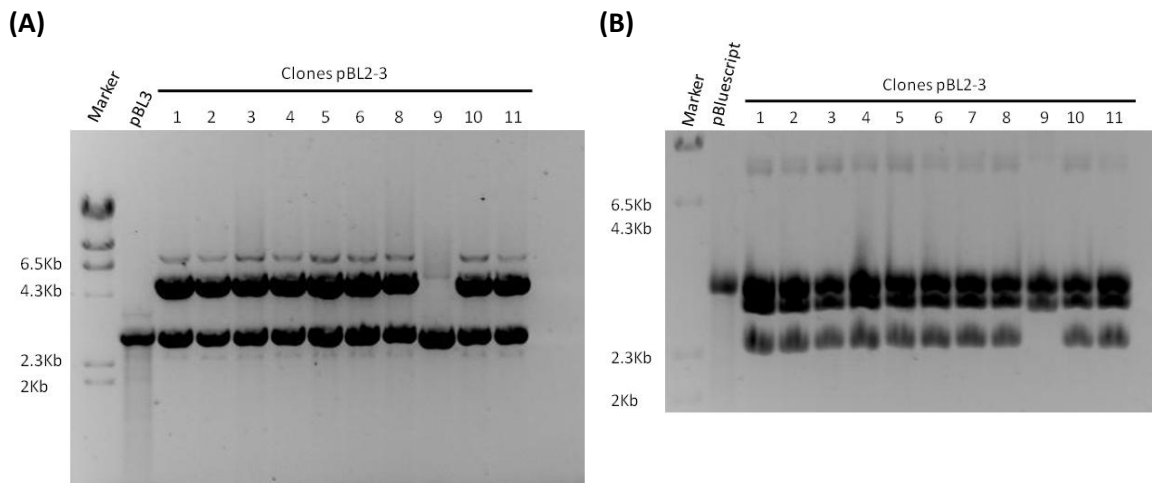


Figura 4.2.9. Unión de los segmentos L2 y L3. Doble *screening* para identificar las colonias recombinantes del subclonado del segmento L2 en pBL3. **(A)** Corte de los ADNs extraídos de las colonias 1-11 con las ERs EcoRV y NotI. (Por un error se omitió el clon 7) **(B)** Idem pero cortado con las ERs EcoRI, EcoRV y NotI. El corte de los plásmidos originales, pBL3 y pBluescript SKII, están indicados en los paneles A y B, respectivamente. El único clon que no incorporó a L3 fue el 9.

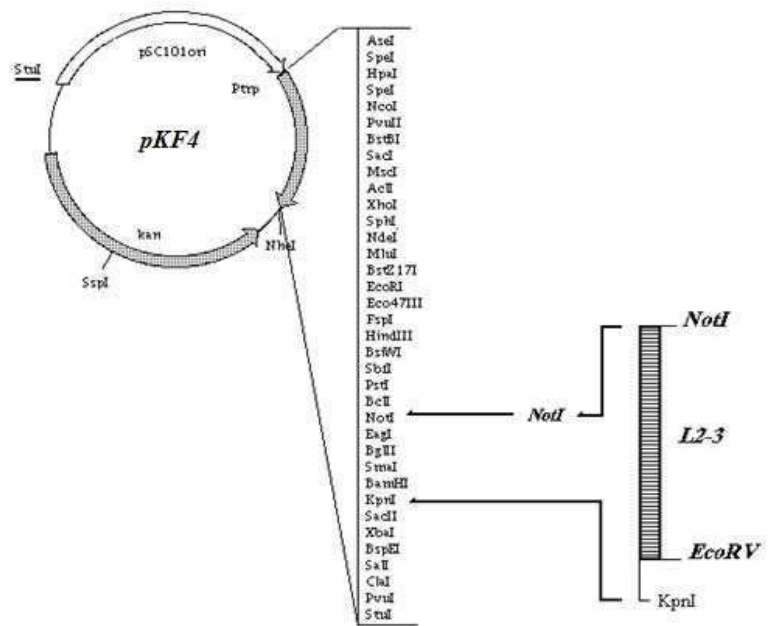


Figura 4.2.10. Esquema del subclonado del segmento L2-3 en el plásmido pKF4.

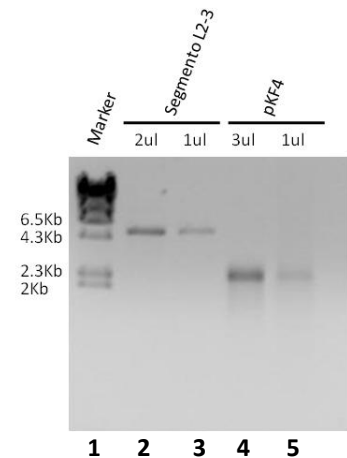


Figura 4.2.11. Electroforesis del segmento L2-3 (calles 2-3) y el plásmido pKF4 (calles 3-4), digeridos con las ERs Not I y KpnI y purificados.

Por último se subclonó el segmento L2-3 en el plásmido pKF4 (en el cual quedará ensamblado el clon completo) con las ERs NotI y KpnI, ya que el plásmido pKF4 no posee sitio de corte para la ER EcoRV, y la ER KpnI en el genoma de VFA O1/Campos no posee sitios de corte río abajo del sitio NotI (Fig. 4.2.10). Los ADNs fueron digeridos con las ERs

correspondientes, el plásmido vacío fue tratado con fosfatasa alcalina y finalmente se purificaron los ADNs mediante una electroforesis preparativa (Fig. 4.2.11). Luego se realizó una reacción de ligación y una transformación en bacterias competentes. Por medio del “*toothpick assay*” se realizó un amplio *screening* de las colonias obtenidas, y se analizaron las colonias candidatas por restricción. El gel donde se detectó el clon positivo por linealización con la ER EcoRV se puede observar en la Fig. 4.2.12A, al igual que dos diferentes restricciones realizadas para verificar la identidad del inserto (Fig. 4.2.12 B y C).

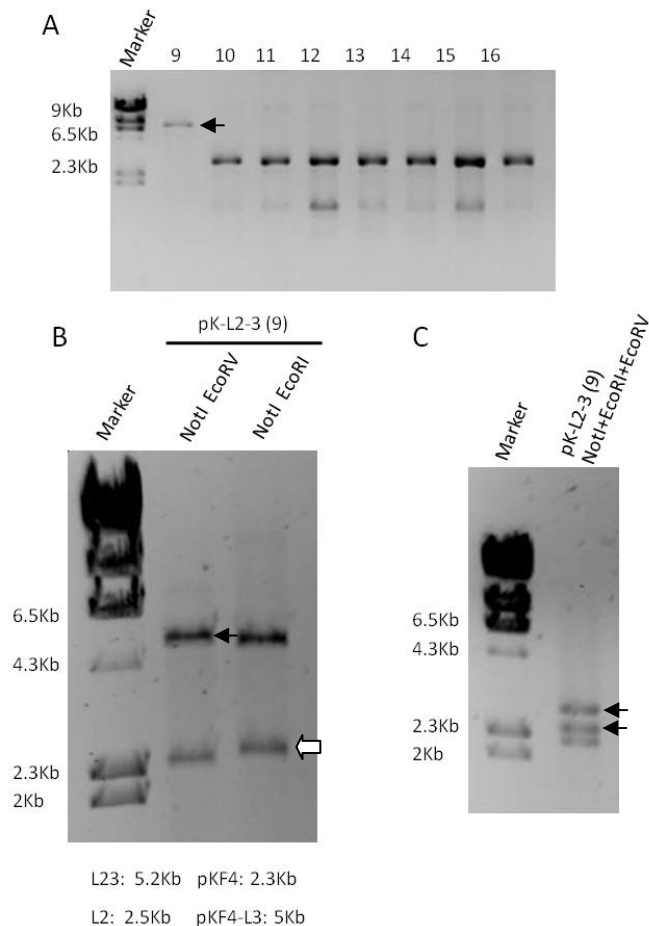


Figura 4.2.12. Identificación de las colonias recombinantes del subclonado del segmento L2-3 en el plásmido pKF4.

(A) Linealización de los ADNs (pK-L2-3) con la ER EcoRV. La flecha marca el clon positivo **(B)** Digestión del ADN de pK-L2-3 con las ERs NotI y EcoRV (calle 2) donde se libera el segmento L2-3 (flecha negra), y con las ERs NotI y EcoRI (calle 3) donde se libera el segmento L2 (flecha blanca). **(C)** Restricción del ADN de pK-L2-3 con las ERs NotI, EcoRI y EcoRV. Esta digestión separa los segmentos L2 (2,5 Kb), L3 (2,7 Kb) indicado por las flechas, y el esqueleto de pKF4 (2,3 kb).

4.2.6. Ensamblado del fragmento S-L1.

Para el ensamblado del segmento S-L1 el primer paso fue subclonar el segmento L1 en el plásmido pBluescript SKII (Fig. 4.2.13A). Con este fin se digirieron la construcción pG-L1 y el plásmido vacío pBluescript SKII con las ERs SpeI y NotI y se trató este último con fosfatasa alcalina. Una vez purificados los fragmentos de interés se realizó una reacción de ligación entre ambos, se transformaron bacterias competentes y se realizó un *screening* para identificar las colonias recombinantes. Luego de analizar un alto número de colonias se identificaron 2 colonias recombinantes y se verificó su identidad (Fig. 4.2.13B).

Con el fin de ensamblar la mitad 5' del genoma [excluyendo el poli(C)] se clonó a continuación del segmento L1 el segmento S utilizando la ER SpeI (Fig. 4.2.14).

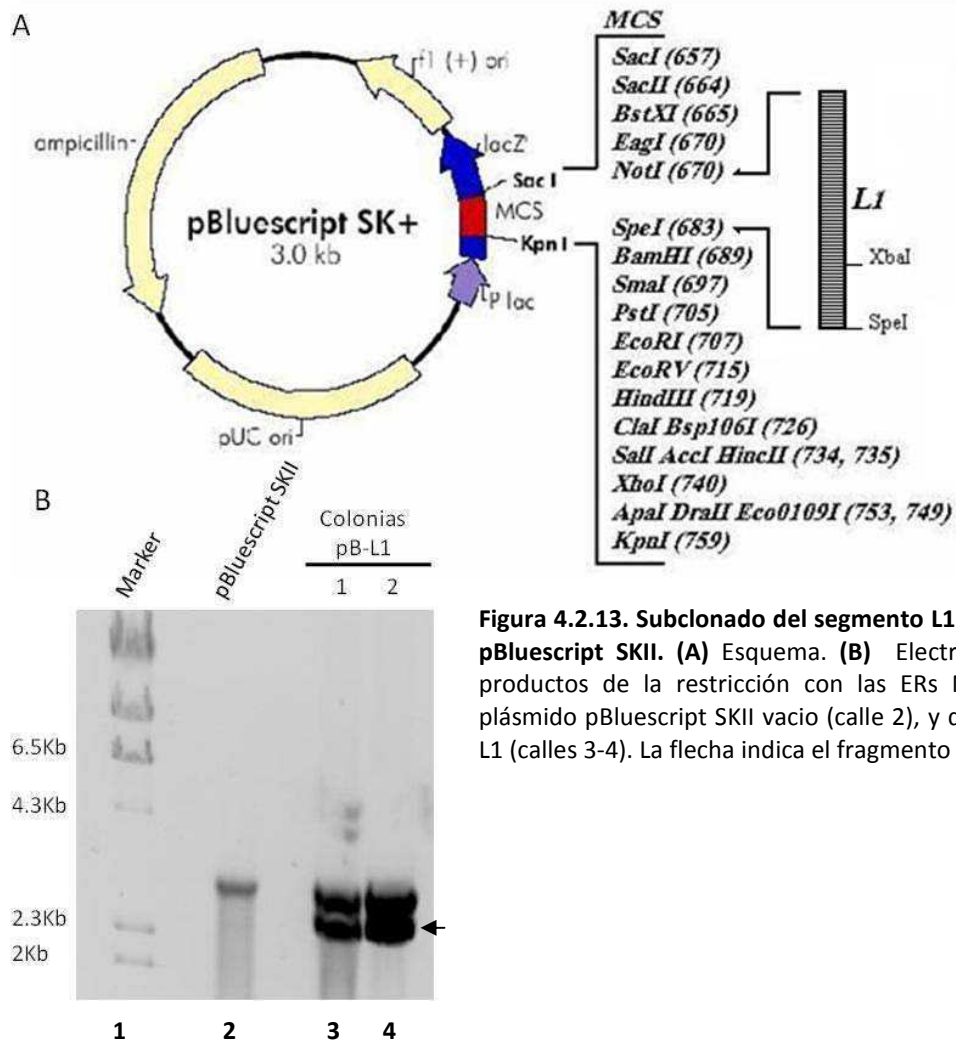


Figura 4.2.13. Subclonado del segmento L1 en el plásmido pBluescript SKII. (A) Esquema. **(B)** Electroforesis de los productos de la restricción con las ERs NotI y SpeI de plásmido pBluescript SKII vacío (calle 2), y de los ADNs pB-L1 (calles 3-4). La flecha indica el fragmento L1.

A continuación se digirieron los plásmidos pB-L1 y el pG-S con la ER SpeI, se trató el pB-L1 con fosfatasa alcalina, y posteriormente se aislaron los segmentos de interés mediante electroforesis preparativas en gel de agarosa, se ligaron y se verificó que estas colonias posean el inserto por medio de la ER SpeI, así como la orientación del clonado con las ERs XbaI y AlwNI (Fig. 4.2.15A). La elección de estas ERs se realizó en base a que XbaI posee un solo sitio de corte en la secuencia de L1 y AlwNI posee un sitio de corte en el vector pBluescript SKII y un sitio de corte en la posición 48 del genoma de la cepa O1/Campos. Este sitio de corte en uno de los extremos del fragmento S sirvió para verificar la orientación del mismo (Fig. 4.2.15B). Los ADNs seleccionados se secuenciaron para verificar la orientación del segmento S y el sitio de unión entre S y L1.

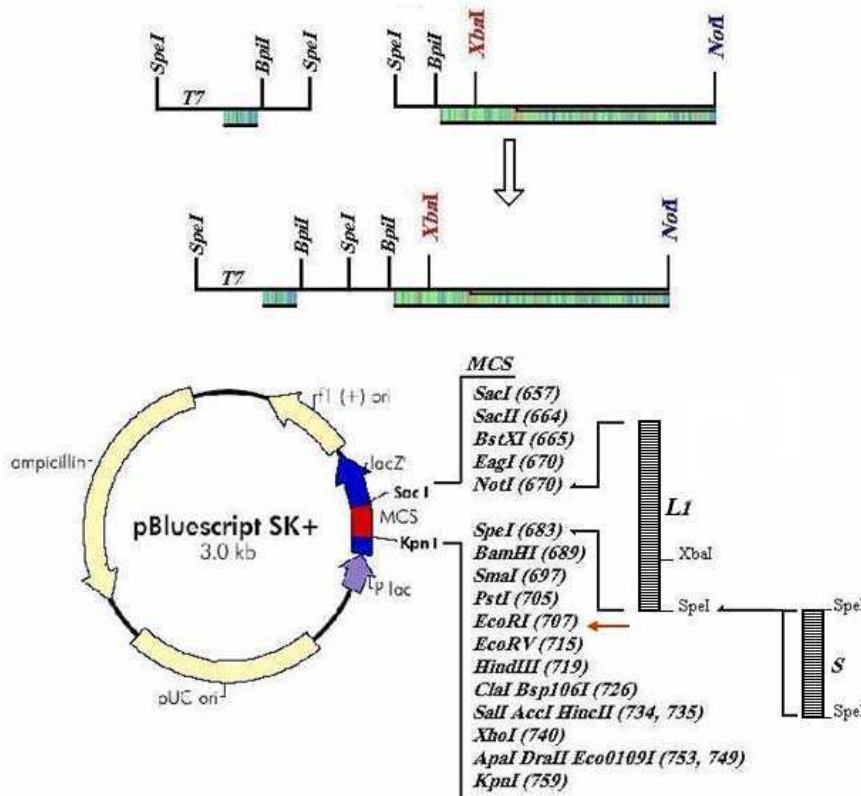


Figura 4.2.14.

Esquema del ensamblado de los segmentos S y L1 en el plásmido pBluescript SKII. El sitio de corte para la ER *EcoRI* en el plásmido pBluescript SKII indicado con una flecha será utilizado en pasos posteriores.

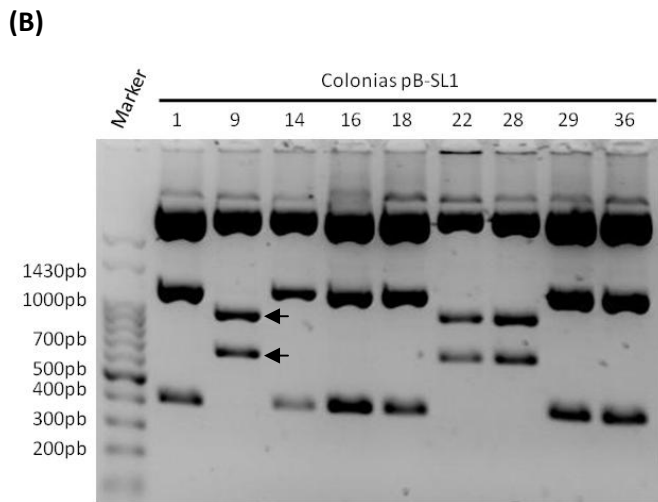
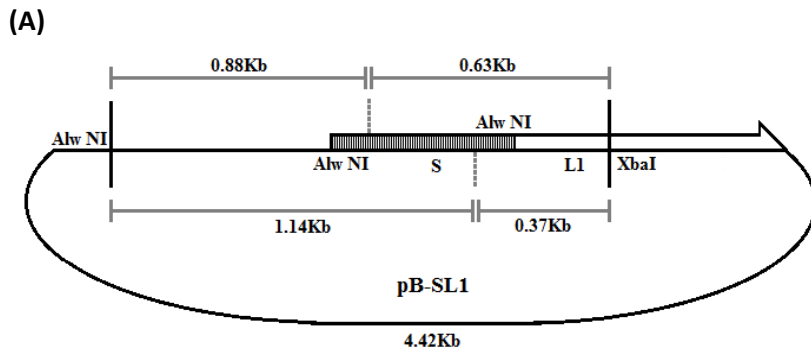


Figura 4.2.15. Segmento S-L1.

(A) Esquema de la construcción pB-SL1 con detalle de las ubicaciones y distancias entre los sitios de corte de las ERs AlwNI y XbaI en las dos posibles orientaciones del segmento S.

(B) Electroforesis de los productos de restricción de los ADNs obtenidos con AlwNI y XbaI. Las colonias 9, 22 y 28 muestran el segmento clonado en la orientación correcta. Las flechas indican los fragmentos de 880 y 630 pb.

4.2.7. Subclonado de un sector acotado del fragmento S-L1 (S-L1a) para la inserción del tracto de poli(C).

Debido a la presencia de numerosos sitios de corte para la ER Bpil [que se utilizó para la inserción del poli(C)] tanto el genoma de como en el plásmido pBluescriptSKII, se subclonó un fragmento acotado de S-L1 (S-L1a) en el vector pKF4 (Fig. 4.2.16). Por ello se digirieron pB-SL1 y el plásmido pKF4 vacío con EcoRI y XbaI, se trato con fosfatasa alcalina al plásmido pKF4 cortado y posteriormente se purificaron ambos ADNs. Luego de la ligación y transformación de bacterias competentes, se obtuvo pK-SL1a. En la Fig. 4.2.17 puede observarse el resultado de una digestión con las ERs EcoRI y XbaI de algunos de los ADNs obtenidos.

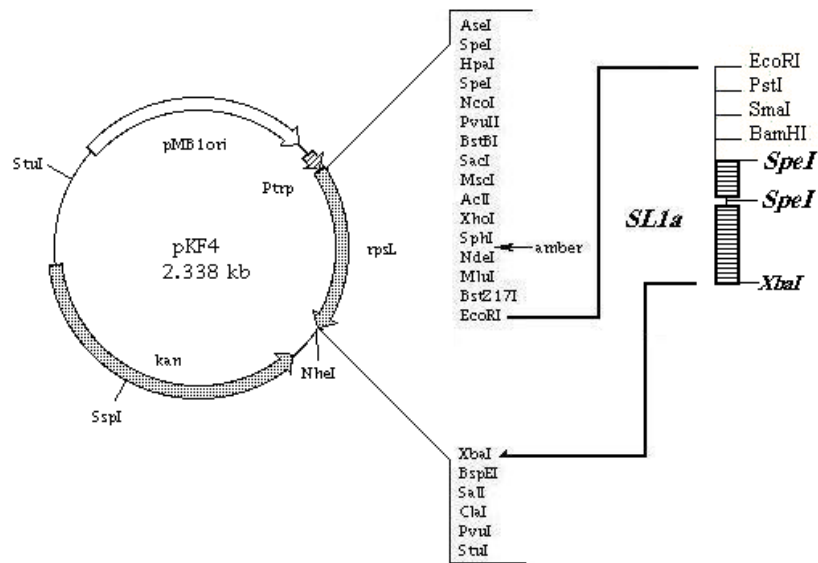


Figura 4.2.16. Esquema del subclonado del segmento SL1a en el plásmido pKF4.

Para la adición del tracto de poli(C) se utilizó un oligonucleótido de doble cadena conformado por un tracto homopolimérico de 20 citocinas que posee la secuencia TTCA en su extremo 5' y un segundo oligonucleótido de cadena simple constituido de un tracto homopolimérico de 20 guanosinas precedidas por la secuencia CCTA en su extremo 5'.

Estos oligonucleótidos se mezclaron en cantidades equimolares y se sometieron a un tratamiento térmico de: 94 °C por 30 segundos, 80 °C por 30 segundos, 70 °C por 30 segundos y posteriormente se llevó la mezcla a temperatura ambiente lentamente. De esta forma se favoreció la formación del ADN dúplex con apareamiento del tracto homopolimérico, como se muestra con la variación de la movilidad electroforética de la mezcla de primers antes y después de la reacción (Fig. 4.2.19A).

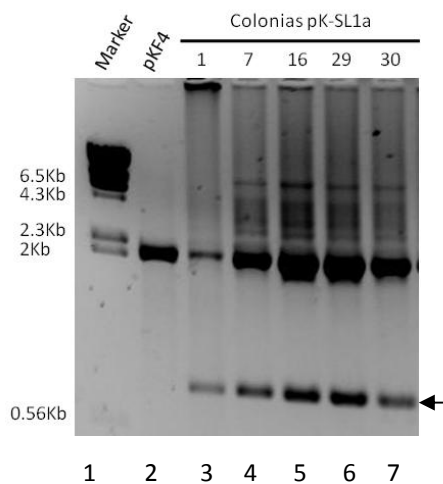


Figura 4.2.17. Subclonado del fragmento S-L1a en el plásmido pKF4. Identificación de colonias positivas por restricción con EcoRI y XbaI. Calle 1: mar cadores de PM. Calle 2: plásmido pKF4 vacío. Calles 3-7: ADNs de colonias positivas (pK-SL1a). La flecha indica el segmento SL1a.

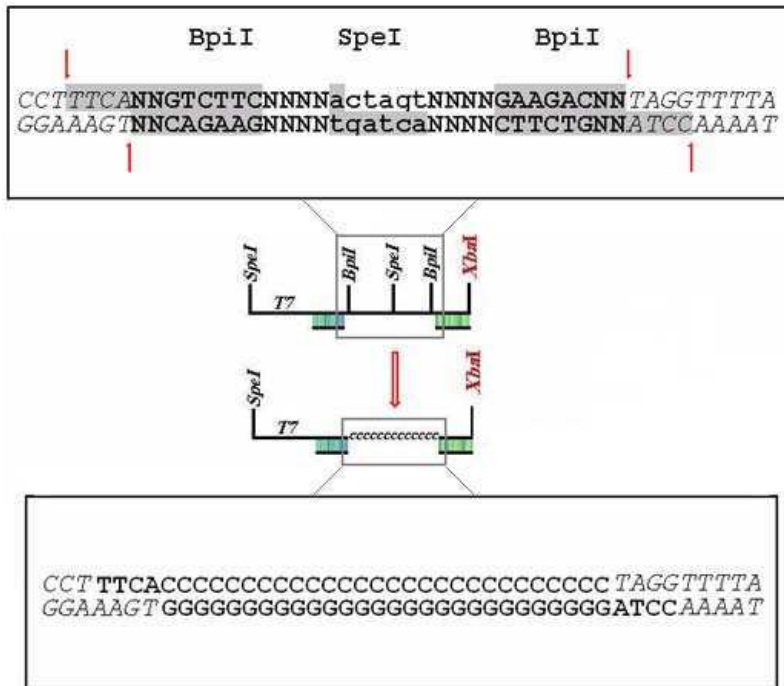


Figura 4.2.18. Esquema de la zona de unión entre los segmentos S y L1. Se detallan los sitios de corte para ERs utilizados para su clonado y para la adición del tracto de poli(C). Se señalan con flechas los sitios donde corta la doble cadena la ER BpiI y los extremos cohesivos que genera. En la parte inferior se muestra como se inserta el tracto de poli(C) con los extremos cohesivos generados.

A continuación se digirió pK-SL1a con la ER BpiI, lo cual deja extremos cohesivos de 4 nucleótidos de longitud que corresponden a la secuencia genómica de VFA O1/Campos inmediatamente adyacente al tracto de poli(C) a ambos lados del mismo (ver esquema explicativo en la Fig. 4.2.18). Cabe aclarar que en este caso, dado que el ADN de los oligonucleótidos sintéticos no posee grupos fosfatos en sus extremos 5', no puede utilizarse fosfatasa alcalina, ya que se necesitan los grupos fosfato del plásmido para poder realizar el ligado del inserto.

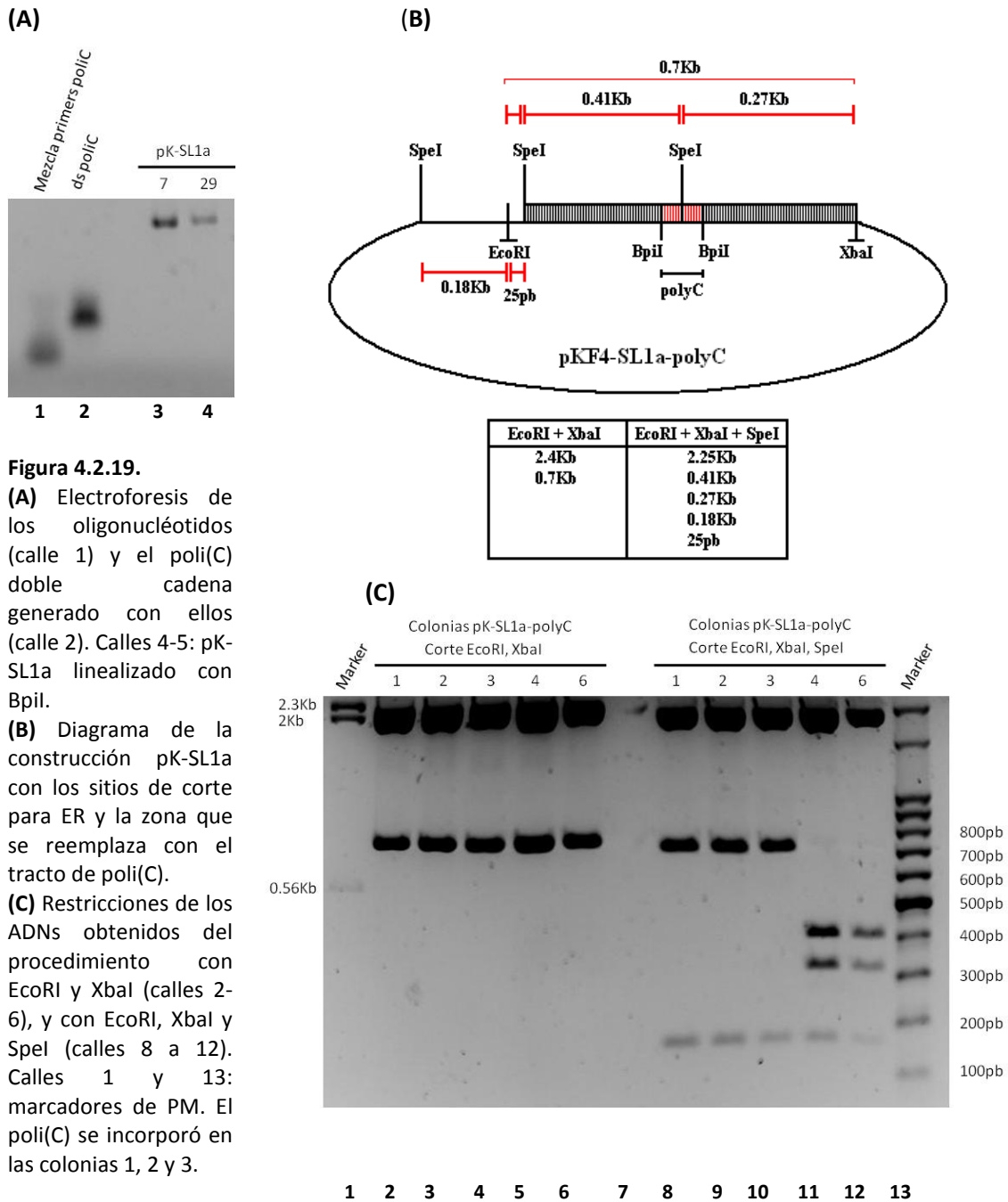


Figura 4.2.19.

(A) Electroforesis de los oligonucleótidos (calle 1) y el poli(C) doble cadena generado con ellos (calle 2). Calles 4-5: pK-SL1a linealizado con BpiI.

(B) Diagrama de la construcción pK-SL1a con los sitios de corte para ER y la zona que se reemplaza con el tracto de poli(C).

(C) Restriciones de los ADNs obtenidos del procedimiento con EcoRI y XbaI (calles 2-6), y con EcoRI, XbaI y SpeI (calles 8 a 12). Calles 1 y 13: marcadores de PM. El poli(C) se incorporó en las colonias 1, 2 y 3.

Una vez purificado el plásmido por medio de una electroforesis preparativa (Fig. 4.2.19A) se realizó la ligación de pK-SL1a con el oligonucleótido doble cadena que contiene el poli(C) [fragmento S-L1a-p(C)].

Dado que el plásmido linealizado con BpiI no se separa por electroforesis del que fue cortado con EcoRI y XbaI, pues solo difieren en 20 bp, sumado a que el plásmido no fue tratado con fosfatasa alcalina, era esperable encontrar una gran cantidad de colonias para analizar. Si a esto le sumamos que los ADNs recombinantes no pueden ser diferenciados por tamaño de

aquellos que son producto del religado, tendremos un *screening* para identificar los ADN recombinantes que será muy extenso y trabajoso. Por lo tanto, se planeó la siguiente estrategia: previo a la transformación de bacterias competentes se realizó una nueva restricción con la ER Bpil, considerando que cuando se produce el clonado del poli(C) se pierden estos sitios de corte, resultando en una disminución importante del número de colonias finales resultado del religado del plásmido. Para identificar las colonias recombinantes se realizó corte con las ERs EcoRI, XbaI y SpeI, diferenciando claramente aquellos ADN que han incorporado de forma exitosa el tracto de poli(C) en remplazo de la secuencia sintética que posee los sitios de corte para Bpil y SpeI (Fig. 4.2.19 B y C).

Una vez identificados los clones positivos se secuenciaron tres de ellos para corroborar la correcta incorporación del tracto de poli(C) y la longitud del mismo (Fig. 4.2.20).

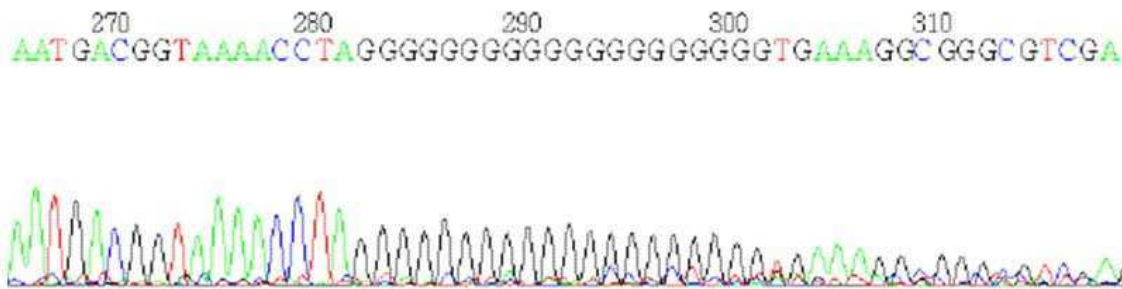


Figura 4.2.20. Secuencia de la hebra complementaria del ADN de la construcción pK-SL1p(C) en la zona donde se ubica el tracto de poli(C).

4.2.8 Reconstrucción del fragmento S-L1 incluyendo el tracto de poli(C) [S-L1p(C)].

Posteriormente se reconstruyó la mitad 5' del genoma clonando el segmento SL1a-poli(C) en la construcción pB-L1 con las ERs EcoRI y XbaI (Fig. 4.2.21). De esta forma se completó el fragmento faltante de L1, reconstruyendo así la mitad 5' del genoma que ahora incluye el tracto de poli(C). Con ese fin se digirieron ambos ADNs con las ERs anteriormente mencionadas, se trató el pB-L1 digerido con fosfatasa alcalina y posteriormente se purificaron los ADNs. Se realizó la ligación entre ambos y se transformaron bacterias competentes. El *screening* de las colonias resultantes se realizó con las ERs XbaI y SpeI (Fig. 4.2.22). Una vez identificadas las colonias positivas se confirmó por secuenciación tanto la identidad de las mismas como la estabilidad del tracto de poli(C).

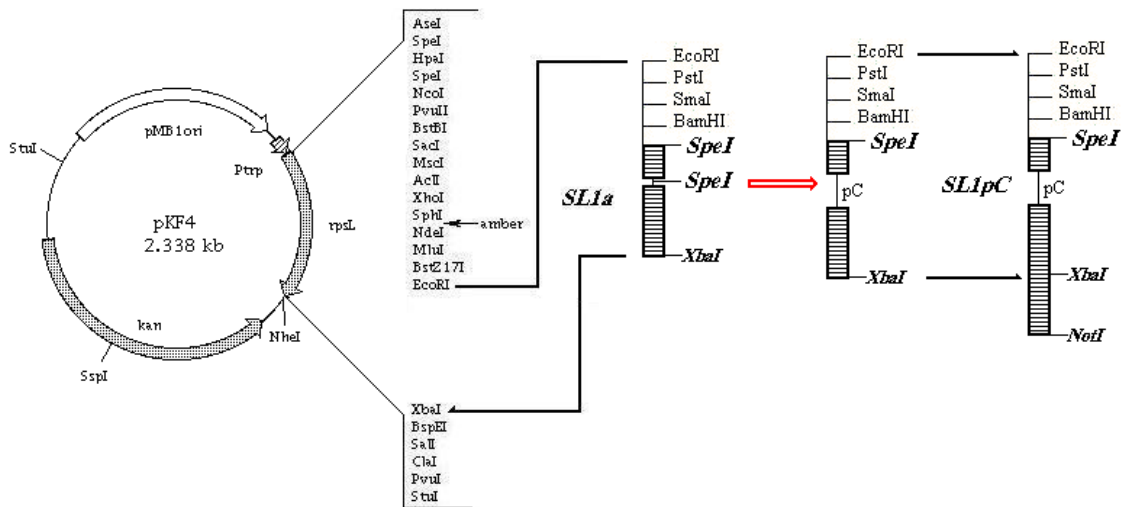


Figura 4.2.21. Diagrama explicativo de la reconstrucción del segmento SL1 incluyendo el tracto de poli(C).

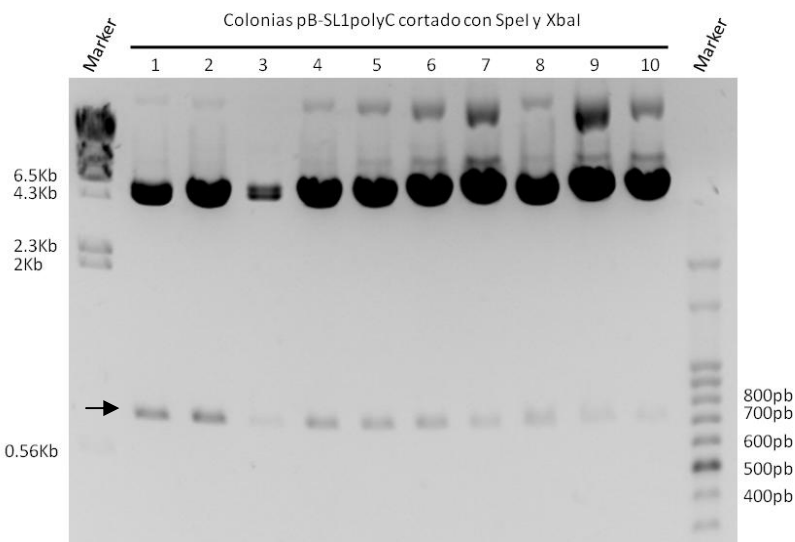


Figura 4.2.22. Restricción de los ADNs de pB-SL1pC con las ERs SpeI y XbaI. El fragmento SL1a-pC (700 pb) se encuentra señalado por la flecha.

4.2.9. Ensamblado final de las mitades 3' y 5' de la copia genómica del VFA O1/Campos.

A continuación se unieron las dos mitades del clon genómico clonando el segmento SL1- poli(C) en la construcción pK-L2-3 que ya posee la mitad 3' del genoma del VFA (Fig. 4.2.23), utilizando las ERs NotI y SpeI. Cabe recordar que NotI posee un único sitio de corte en el genoma en la posición 3006 y, posteriormente al clonado del tracto de poli(C), solo hay un sitio de corte para SpeI que se encuentra río arriba del promotor T7 (posición 22 con respecto a la secuencia genómica del VFA). La construcción pK-L2-3, que se utiliza como plásmido receptor de inserto SL1-poly(C), se digirió con estas ERs, se trató con fosfatasa alcalina y se purificó el ADN.

La construcción pB-SL1poly(C) se digirió también con las ERs *NotI* y *SpeI*. En este caso no es posible separar por tamaño el segmento SL1poly(C) del esqueleto del plásmido pBluescript SKII donde se encontraba clonado (3046 y 3000 pares de bases, respectivamente).

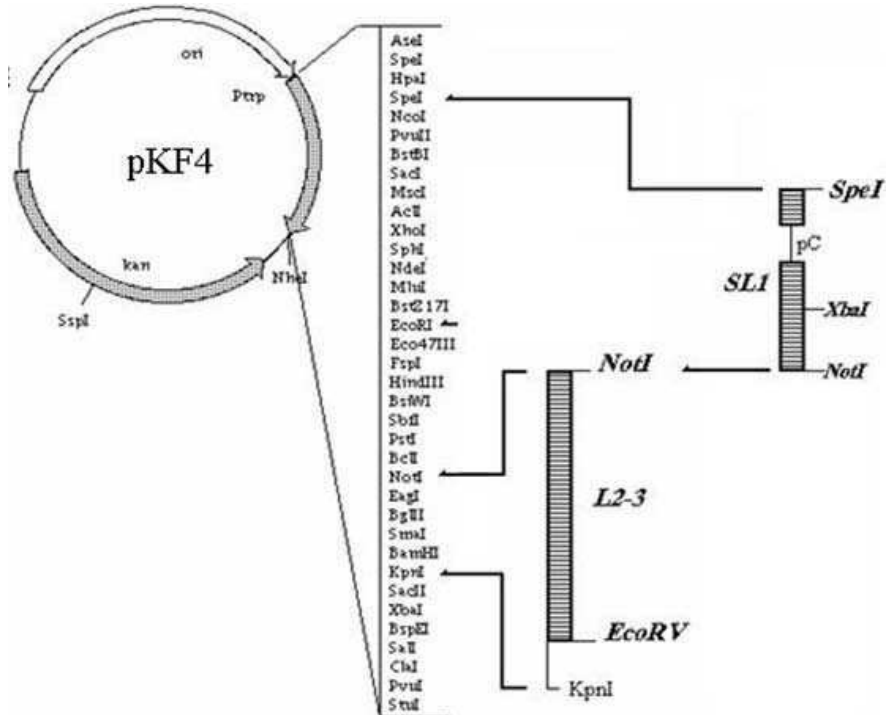


Figura 4.2.23. Esquema del ensamblado de las dos mitades del clon.

Por esta razón este ADN después de ser digerido se sometió a un tratamiento con calor (80 °C 20 min) para inactivar las ERs y luego se purificó el ADN por precipitación con acetato de sodio y etanol. Una vez obtenidos ambos ADNs, se realizó la ligación de los mismos y la transformación de bacterias competentes.

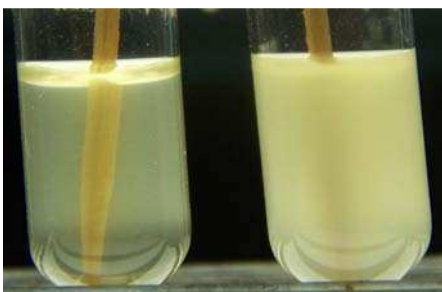


Figura 4.2.24. Cultivos bacterianos. Fotografía de los dos tipos de cultivos de bacterias transfectadas con el producto de ligación del segmento SL1pC con pK-L2-3. Puede observarse como luego de un cultivo ON, el cultivo de la derecha llega al *plateau* de crecimiento mientras que el de la izquierda posee un grado de turbidez mucho menor.

Al realizar los cultivos de las colonias obtenidas de la transformación se observaron claramente dos tipos diferentes: uno de crecimiento normal (llega al *plateau* de crecimiento

en cultivos *overnight*) y otro de crecimiento lento (el medio de cultivo se sigue observando translúcido luego de un cultivo *overnight*) como puede observarse en la Fig. 4.2.24. A priori no es posible saber si estas características están relacionadas a los diferentes genotipos resultantes de la ligación. Dado que el inserto y el esqueleto del plásmido pBluescript SKII poseen tamaños muy similares no se puede diferenciarlos por medio de restricción con las ERs utilizadas para clonarlos, por lo que se realizó el *screening* con la ER XbaI (Fig. 4.2.25A).

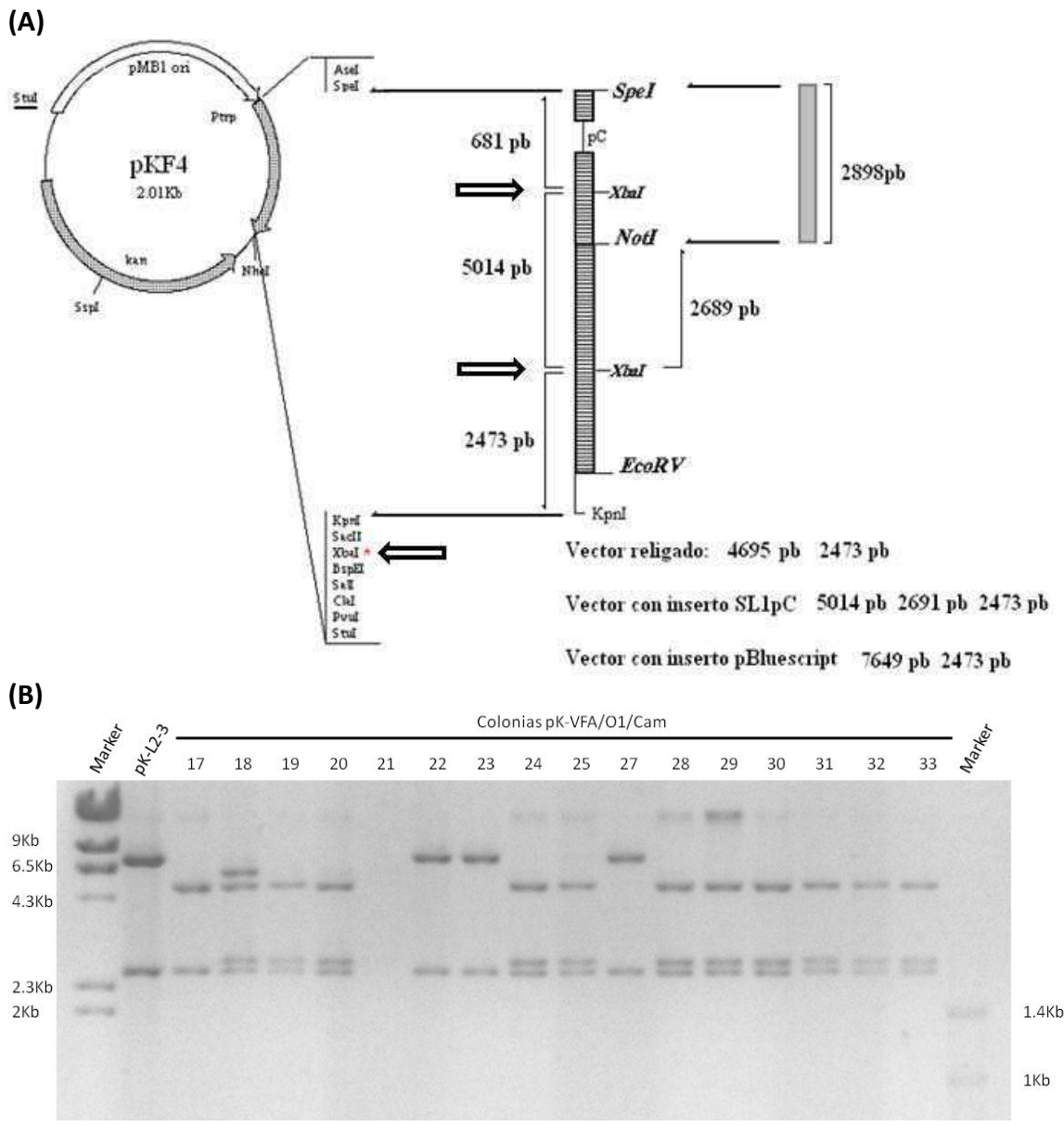


Figura 4.2.25. (A) Esquema ejemplificando las ubicaciones de los sitios de corte para la ER XbaI dependiendo de la incorporación del inserto en la construcción. **(B)** Electroforesis de la restricción con XbaI de los ADNs obtenidos de pK-VFA/O1/Cam. Las colonias positivas son las número 19, 20, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 32 y 33.

Los fragmentos resultantes de la restricción de estos ADNs son fácilmente diferenciables en una electroforesis, por lo cual se la utilizó para identificar los clones que poseen la secuencia completa del VFA por el patrón de restricción esperado para el genoma del VFA (Fig. 4.2.25B).

Llegado este punto, cabe aclarar que los clones con fenotipo de crecimiento lento, fueron los que poseen el genoma del VFA O1/Campos clonado. El crecimiento sub-óptimo de las colonias que poseen el clon *full length* podría deberse, entre otras cosas, al alto contenido de G-C de la secuencia del VFA, al tracto de poli(C) o una suma de factores.

Para verificar la estabilidad del tracto de poli(C) y completar la secuencia del clon se realizó una maxipreparación de ADN de uno de los clones positivos y se envió a secuenciar, en especial la región que comprende el tracto de poli(C), la zona de unión de ambas mitades del clon (correspondiente al sitio de corte de la ER NotI) y todas las regiones que no habían sido abarcadas en la secuenciación anterior de pK-L2-3 y pBSL1.

4.3.1. Análisis de la secuencia completa de la copia del genoma de O1/Campos.

Como se comentó anteriormente, se reconstruyó la secuencia completa del clon utilizando las secuencias ya obtenidas de las mitades del mismo, y secuenciando las regiones faltantes. De las 38 secuencias obtenidas se analizaron los electroferogramas y se eliminaron los extremos donde la calidad de la secuencia es mala. Una vez terminado este paso se alinearon las secuencias (Fig. 4.3.1) con la aplicación *Contig Express* del programa *VectorNTI Suite*, y de dicho alineamiento se obtuvo la secuencia consenso con la cual se efectuaron los análisis. Para las comparaciones de secuencias se utilizó la aplicación *AlignX* del programa anteriormente mencionado.

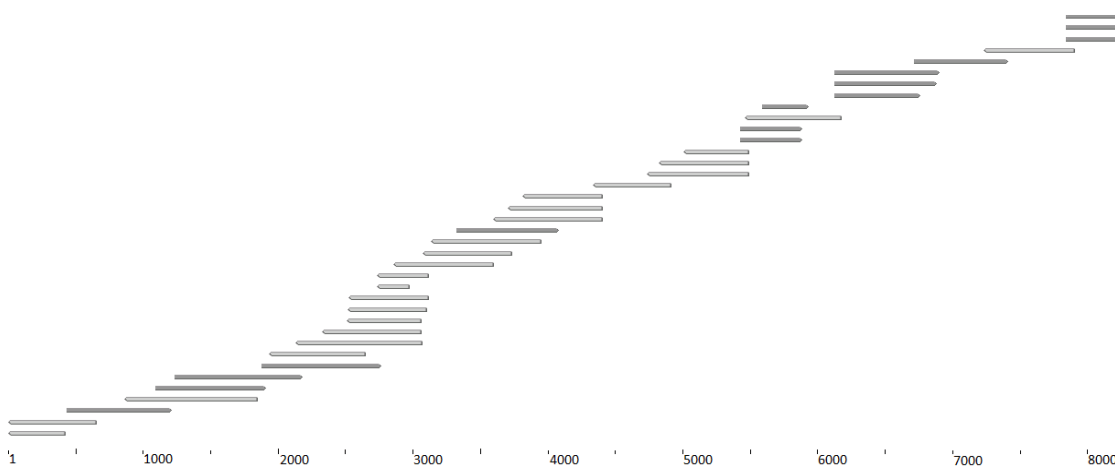


Figura 4.3.1 Diagrama del solapamiento de las secuencias del clon para la reconstrucción de la secuencia completa. Los segmentos en gris oscuro representan secuencias en el sentido 5'-3' de la secuencia viral, los restantes son secuencias correspondientes a la hebra complementaria.

Del análisis de la secuencia final del clon se observó que:

- El tracto del poli(C) se mantuvo estable, tanto en longitud como en secuencia, así como las zonas circundantes del mismo.
- No se detectaron inserciones ni deleciones en la secuencia.
- Se observaron 76 cambios en la región correspondiente a la secuencia reportada de la cepa O1/Campos, 15 de ellas ubicadas en las zonas 5' y 3' no codificantes y las 61 restantes en la región correspondiente a la poliproteína viral.
- De los cambios en el marco abierto de lectura viral, no se detectaron codones de terminación prematuros, 41 de ellas corresponden a mutaciones silenciosas y 20 producen un cambio de aa con respecto a la secuencia reportada de la cepa O1/Campos.
- De los cambios que producen cambios de aa, una se encuentra en la proteasa L, 10 en las proteínas estructurales y 9 en las proteínas no estructurales.
- Los cambios de aa resultantes de la secuencia del clon, con respecto a la secuencia reportada de O1/Campos, se resumen en la Tabla 4.3.1.

Tabla 4.3.1. Cambios detectados en la secuencia de aa

Aminoácido	Posición en la poliproteína	Aminoácido en O1/Campos	Aminoácido	Posición en la poliproteína	Aminoácido en O1/Campos
D	46	N	A	868	V
T	397	A	I	1056	V
R	416	C	A	1074	V
H	560	R	V	1113	I
D	564	G	T	1236	A
I	569	T	T	1355	I
S	603	T	I	1487	V
A	737	T	V	1559	A
E	765	K	P	1947	L
K	857	E	R	2322	L

4.4. Transfecciones con ADN plasmídico.

4. 4.1. Cotransfección de células BHK21 con el ADN linealizado del plásmido pK-VFA/O1/Cam más un vector que sobreexpresa la polimerasa T7.

Desde que Argentina fue declarada libre de fiebre aftosa con vacunación solo pueden realizarse ensayos con viriones que posean capacidad infectiva en laboratorios de bioseguridad de nivel 3 Agricultura (NBS3A o 4 OIE). Dado que el instituto en que se llevó a cabo el trabajo de esta tesis no posee aún un laboratorio con dichas características se consiguió permiso del área de virología del SENASA para poder ingresar a realizar los ensayos que involucren la obtención de viriones en el laboratorio NBS3A de dicha institución.

Se realizaron cotransfecciones con los plásmidos pT7 (sin linealizar) y pK-VFA/O1/Cam linealizado. El pT7 es un plásmido con capacidad replicativa en células eucariotas que expresa la polimerasa del bacteriófago T7 (T7^{pol}). Adicionalmente se agregó un control negativo transfecando solo con pT7, para asegurar que la sobreexpresión de la polimerasa T7 no produjera un efecto tóxico que pudiera confundirse con el ECP viral. Dado que los horarios en que funciona el laboratorio NBS3A de SENASA no permitían una incubación de la mezcla de tranfección de 6 hs antes de realizar el cambio de medio de cultivo (como recomienda el fabricante) se realizaron dos protocolos diferentes que se ejemplifican en la Tabla 4.4.1.

Tabla 4.4.1. Protocolos de transfección de ADN con Lipofectamina

Tiempo de incubación de las células con la mezcla de transfección	Tratamientos
2 hs 30 min	Cotransfección con ADN de pT7 y pK-VFA/O1/Cam linealizado.
	Transfección con pT7.
	Incubación con lipofectamina sola.
24 hs	Cotransfección con ADN de pT7 y pK-VFA/O1/Cam linealizado
	Incubación solo con lipofectamina

En los casos en que solo se incubó la mezcla de transfección por 2 hs 30 min, dicha mezcla fue removida y reemplazada por 1 ml de medio G-MEM 2 % FBS. En los casos donde la mezcla de transfección se mantuvo por 24 hs, se completó con medio OPTIMEM hasta un volumen total de 1 ml a las 2hs 30 min de comenzada la transfección, y luego se sustituyó el medio de cultivo a las 24 hs por 1 ml de medio G-MEM 2 % FBS. Asimismo se incluyeron controles de células sin transfectar en medio G-MEM 2% FBS y OPTIMEM.

Cumplidas las 48 hs, se observó ECP leve tanto en el tratamiento de cotransfección con pK-VFA/O1/Cam y pT7 como en las células incubadas solo con lipofectamina por 24 hs. En los demás tratamientos no se observaron diferencias significativas con los controles de células sin transfectar. Esto podría deberse a un efecto de la incubación prolongada con lipofectamina, o a la ausencia de FBS.

Posteriormente se realizó un ciclo de congelado y descongelado de las células en su medio de cultivo para producir la lisis y se clarificó el medio por centrifugación.

Se realizó el primer pasaje en células en una placa de 12 pocillos, incubando 0,5 ml del clarificado, para verificar transmisión de ECP en pasajes sucesivos. Luego de 30 min se

reemplazó el medio de cultivo por G-MEM 2 % FBS. Este pasaje se realizó para los clarificados del tratamiento de cotransfección en el cual se observó efecto compatible con ECP y de su control tratado con lipofectamina sin ADNs.

No se observó ECP a las 24-48 hs, por lo tanto se extrajo ARN de las muestras para analizar si el genoma viral se encontraba presente. Para ello se repitió la lisis de las células por congelado y descongelado y se clarificó el medio resultante. Se extrajo una alícuota de 0,3 ml y se inactivó con 0,9 ml de Trizol para ambos tratamientos y se guardó el resto de los clarificados a -80 °C.

4.4.2. Análisis de los resultados de la transfección.

Las alícuotas de ARN en Trizol, se sometieron a un tratamiento con DNAsa y se hizo una retrotranscripción utilizando *random primers*. Luego se realizó una amplificación por PCR, utilizando *primers* diseñados para real-time PCR que, que dan un tamaño de amplicón de aproximadamente 110 pb, por lo que no tan sensible a la integridad del ARN en la muestra original. El resultado de esta PCR fue la amplificación de un ADN del tamaño esperado solo en el extracto celular cotransfectado con pK-VFA/O1/Cam y pT7. En los extractos de células tratadas solo con lipofectamina no se produjo ninguna amplificación (Fig. 4.4.1), así como en una muestra de células cotransfectadas con pK-VFA/O1/Cam y pT7, no sometida a retrotranscripción.

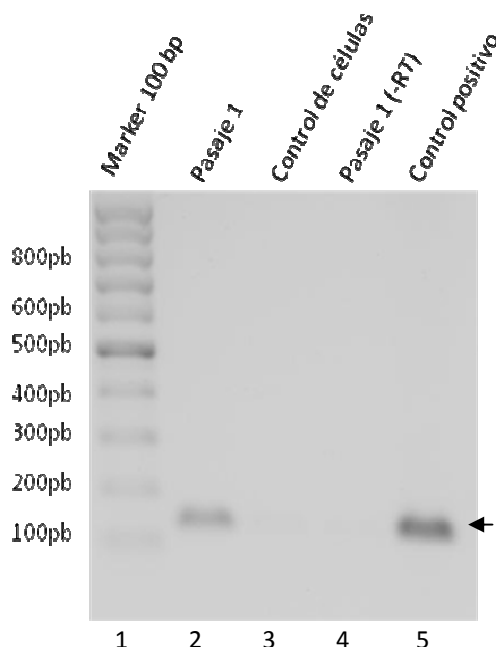


Figura 4.4.1. RT-PCR del ARN extraído post transfección del clon completo de la cepa O1/Campos (pK-VFA/O/P1). Calle 1: marcadores de PM. Calle 2: RT-PCR del primer pasaje (P1) en células. Calle 3: RT-PCR del control de células. Calle 4: PCR del ARN del P1 sin RT. Calle 5: control positivo (pK-VFA/O1/Cam). La flecha indica el segmento del tamaño esperado.

Estos resultados sugieren que, a pesar de no haberse observado ECP en las células tratadas, se detectó ARN viral en la muestra correspondiente al primer pasaje de la

cotransfección y que el producto de la PCR no sería producto de un remanente de ADN en el medio de cultivo proveniente de la mezcla de transfección.

4.4.3. Confirmación de la identidad de ARN viral recuperado.

Para verificar el origen del ARN detectado y descartar que se trate de una contaminación con otras cepas virales con que se trabaja en el laboratorio, se amplificó por PCR [utilizando la polimerasa *Pfx50* (Invitrogen)], la zona que comprende a la proteína estructural VP1, la que se secuenció y comparó con la secuencia de pK-VFA/O1/Cam y con otras existentes en las bases de datos.

Se detectó amplificación de una banda de 1,3 Kb solo en el caso de la cotransfección pK-VFA/O1/Cam + pT7, y solo en el caso en que la muestra fue sometida a retrotranscripción. En este caso el par de *primers* utilizado fue Panaf-Odir / Panaf-LMR.

Comparando las secuencias se encontró que la de esta zona genómica era idéntica a la del pK-VFA/O1/Cam transfectado, conservándose todas las diferencias nucleotídicas con respecto a la secuencia del virus O1/Campos (AJ320488) que figura en las bases de datos (Fig. 4.4.2). Por lo tanto podemos asegurar que el ARN obtenido del primer pasaje en células proviene del clon completo y no de una contaminación externa.

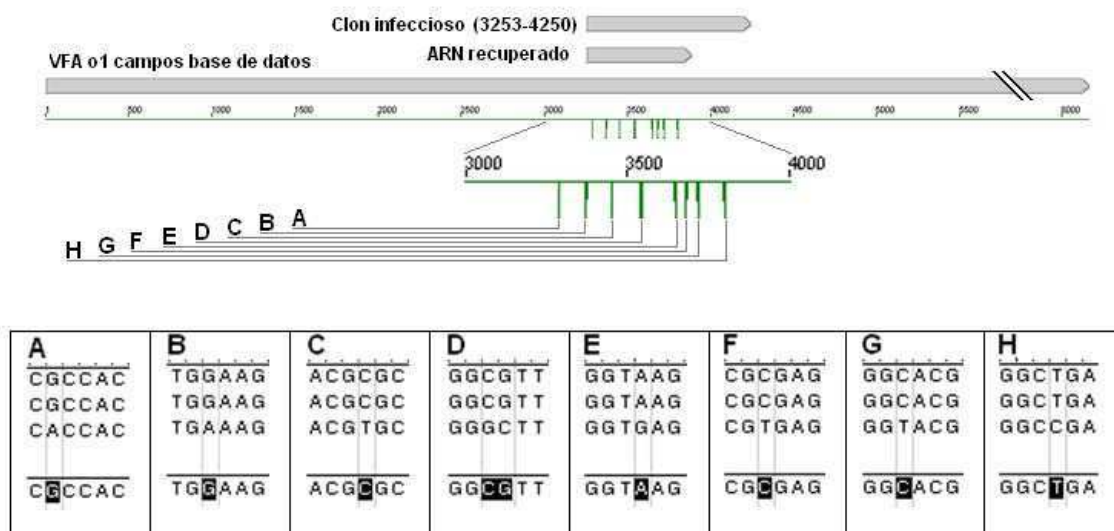


Figura 4.4.2. Alineamiento de las secuencias de pK-VFA/O1/Cam, el amplicón del recuperado del P1 en células (VFA/O/P1) y de la cepa O1/Campos. Se indican 8 posiciones diferentes con respecto a la secuencia reportada de O1/Campos (Nº de acceso AJ320488, casilleros sombreados). El ARN recuperado del P1 en células posee un 100% de identidad con pK-VFA/O1/Cam.

Las siguientes transfecciones se realizaron utilizando ARNs transcritos de pK-VFA/O1/Cam en lugar de ADN plasmídico.

4.5. Transfecciones con ARN genómico.

4.5.1. Transfección ARNs obtenidos por transcripción *in vitro* de pK-VFA/O1/Cam y evaluación de su capacidad infectiva.

Dado que no se obtuvo ECP y que el sistema de transfección con ADN resultó poco eficiente, se continuaron las transfecciones con ARN transcritos a partir de pK-VFA/O1/Cam.

Para ello ADN de pK-VFA/O1/Cam purificado se linealizó con un corte inmediatamente río abajo de la cola de poli(A) con la ER EcoRV y posteriormente se realizó una transcripción *in vitro* utilizando 1 µg de DNA como templado y el kit de transcripción *in vitro* MAXIscript (Ambion), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, seguido de un tratamiento con DNasa I. El ARN se purificó con el kit *SV total RNA isolation system* (Promega) y posteriormente se verificó el tamaño del ARN generado en una electroforesis en gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes (Fig. 4.5.1). Finalmente se cuantificó por absorbancia con el equipo *Nanodrop*.

Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamine® (Invitrogen) como agente transfectante. Adaptando el protocolo al horario del laboratorio NBS3A de SENASA, se realizaron las transfecciones incubando las células con la mezcla de transfección por 3hs en vez de las 5 hs recomendadas por el fabricante. Una vez finalizada la incubación dicha mezcla fue removida y reemplazada por 1 ml de medio G-MEM 2 % FBS. Asimismo se incluyeron controles de células en medio GMEM 2% FBS y controles negativos de transfección (lipofectamina sin ARN), los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones que las transfecciones propiamente dichas.

El estado de las células se evaluó a las 24hs, 48hs y 72hs. Dentro de las 72hs post transfección no pudo observarse ECP en ninguno de los tratamientos. Posteriormente se produjo la lisis celular por congelado y descongelado y se clarificó el medio por centrifugación (VFA/O/PO).

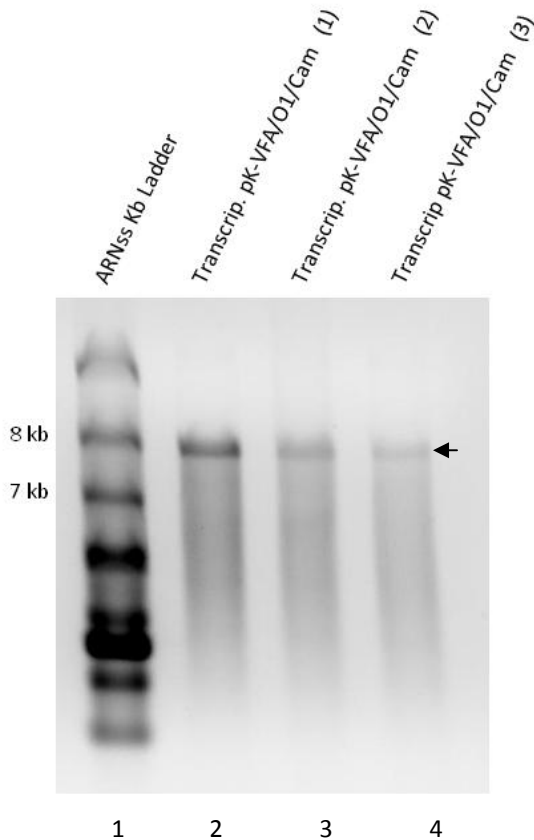


Figura 4.5.1. Integridad del ARN transcrito de pK-VFA/O1/Cam. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes. Calle 1: marcadores de PM. Calles 2-4: ARN transcrito en 3 reacciones independientes.

Con el clarificado se realizó el primer pasaje en células, asumiendo que de haberse formado partículas virales en pequeñas cantidades se deberá aumentar el título de las mismas para poder observar ECP. Con este fin se incubó una nueva monocapa de células con una cuarta parte del volumen total de dicho clarificado durante 1 h (VFA/O/P1). Pasada la hora se reemplazó el medio de cultivo por G-MEM 2 % FBS. Este pasaje se realizó con los clarificados del tratamiento de transfección y los controles.

No se detectó ECP a las 24hs, 48hs y 72hs del primer (VFA/O/P1) o segundo pasaje en células (VFA/O/P2), por lo que se extrajo ARN para verificar la presencia o ausencia de ARN viral en dichos pasajes.

4.5.2. Detección de ARN genómico de cadena positiva.

Se extrajeron alícuotas de 0,3 ml de los clarificados de células de la transfección, los pasajes y los controles negativos con 0,9 ml de Trizol® (Invitrogen), se trataron con DNAsal y se hizo una retrotranscripción con el kit GoScript Reverse Transcription System (Promega) utilizando *random primers*. Luego se realizó una amplificación por PCR, utilizando los *primers* descritos en 4.4.2. El resultado fue la amplificación de un ADN del tamaño esperado (110pb) en el tratamiento de transfección con ARN y sus posteriores pasajes. No hubo amplificación en

las muestra de células tratadas solo con lipofectamina, ni en sus posteriores pasajes (Fig. 4.5.2).

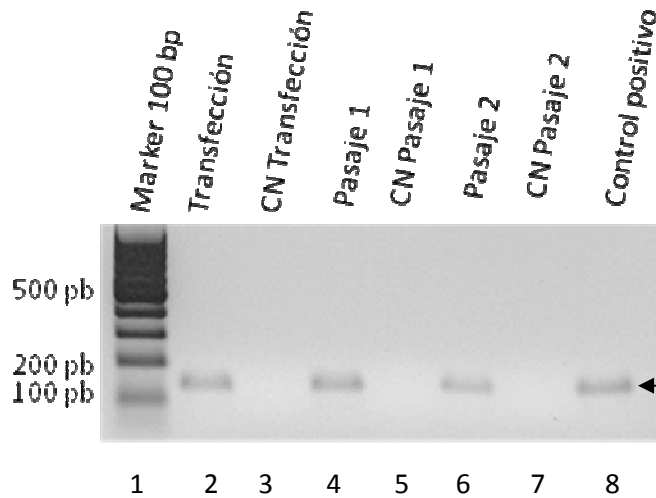


Fig 4.5.2. RT-PCR del ARN extraído post transfección con ARN transcrito de pK-VFA/O/P1. Calle 1: marcadores de PM. Calles 2, 4 y 6: Transfección, P1 y P2 en células. Calles 3, 5 y 7: Controles negativos (células tratadas solo con lipofectamina). Calle 8: control positivo (PCR usando pK-VFA/O1/Cam como templado).

4.5.3. Detección de ARN genómico de cadena negativa.

Adicionalmente, se determinó la presencia de ARN de cadena negativa en la muestra correspondiente al primer pasaje en células (VFA/O/P1), mediante RT con *primers* con la secuencia de la hebra codificante (se utilizaron 2 *primers* diferentes en dos reacciones independientes), e incubándolos a la temperatura de *melting* del *primer* (en vez de en hielo) para evitar el pegado inespecífico de los mismos. En dicha determinación solo se obtuvo amplificación en la muestra correspondiente al primer pasaje en células proveniente de la transfección, mientras que ni el control de células ni las muestras sin someter a RT mostraron amplificación alguna (Fig. 4.5.3).

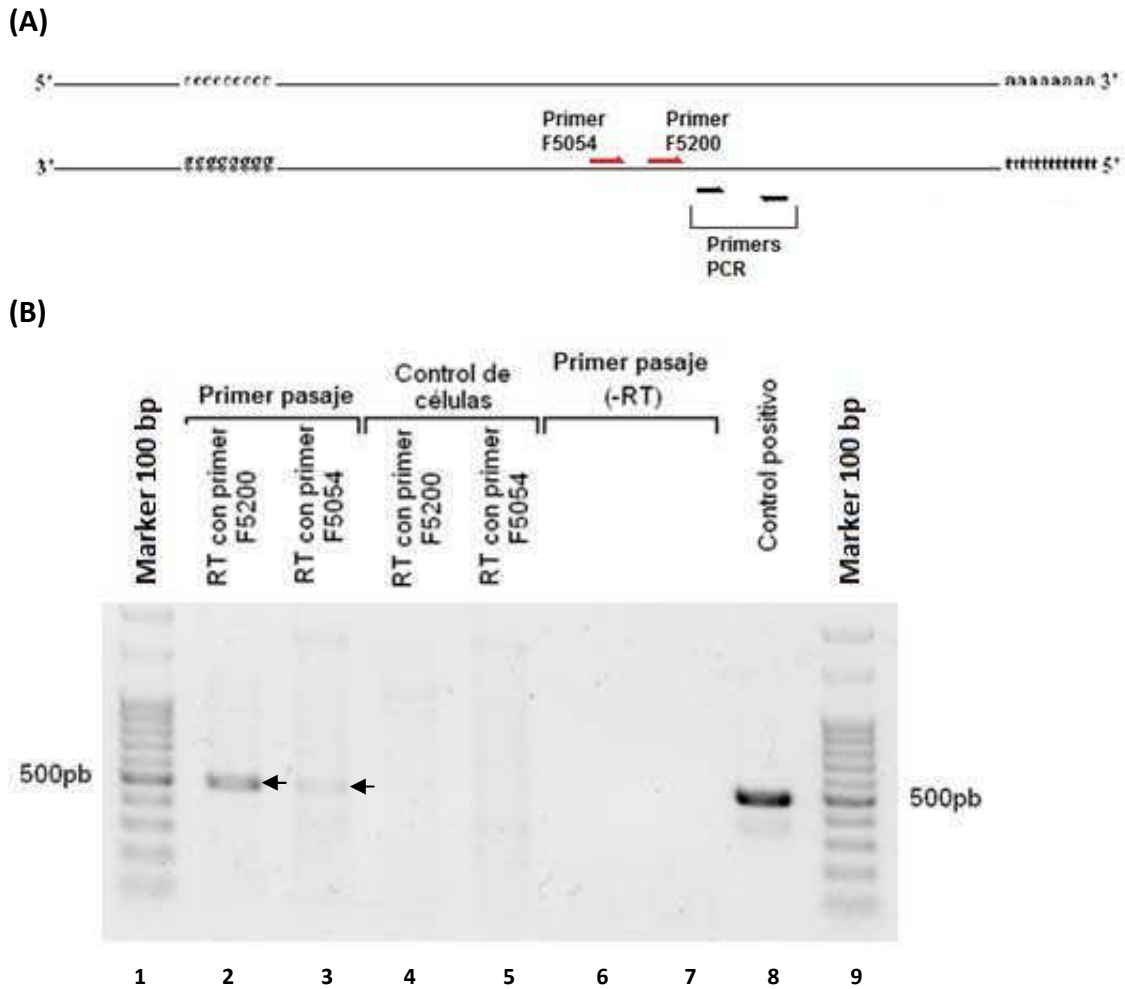


Figura 4.5.3. Detección de la hebra negativa de ARN. (A) Diagrama indicando ubicación de los *primers* (F5054 y F5200) para la síntesis de ADNc a partir de la hebra negativa de ARN (RT) y de los *primers* para la detección por PCR (3AG-F y 3AG-R). (B) RT-PCR de hebra negativa del P1 en células post transfección (calles 2-3), donde la RT se realizó con los *primers* indicados. Calles 4-5: control sin ARN. Calles 6-7: control con ARN pero sin RT. Calle 8: control positivo. Calles 1 y 9: marcadores de PM. Se observa una diferencia en la eficiencia de la RT dependiendo de la distancia a la zona de la secuencia diana que se sitúa el oligonucleótido para la síntesis del ADNc (indicado por las flechas). Las flechas indican el fragmento amplificado.

Estos resultados sugieren que, habiéndose detectado ARN viral en la muestras correspondiente a la transfección y los dos primeros pasajes, y que la transmisión de dicho ácido nucleico entre los pasajes no se debe a una contaminación, sino a la generación de partículas virales, lo cual se ve reforzado por la presencia de ARN de cadena negativa en el primer pasaje en células.

Se realizaron nuevas transfecciones con diferentes cantidades de ARN y utilizando como agentes transfectantes tanto Lipofectamina como DMRIE-C (Invitrogen), utilizando células BHK-21 de diferentes orígenes, y con control estricto de pH del medio de cultivo. Se

realizaron un total de 7 transfecciones con ARN y se realizaron posteriores pasajes en células (hasta un máximo de 5 pasajes), pero en ningún caso se observó ECP.

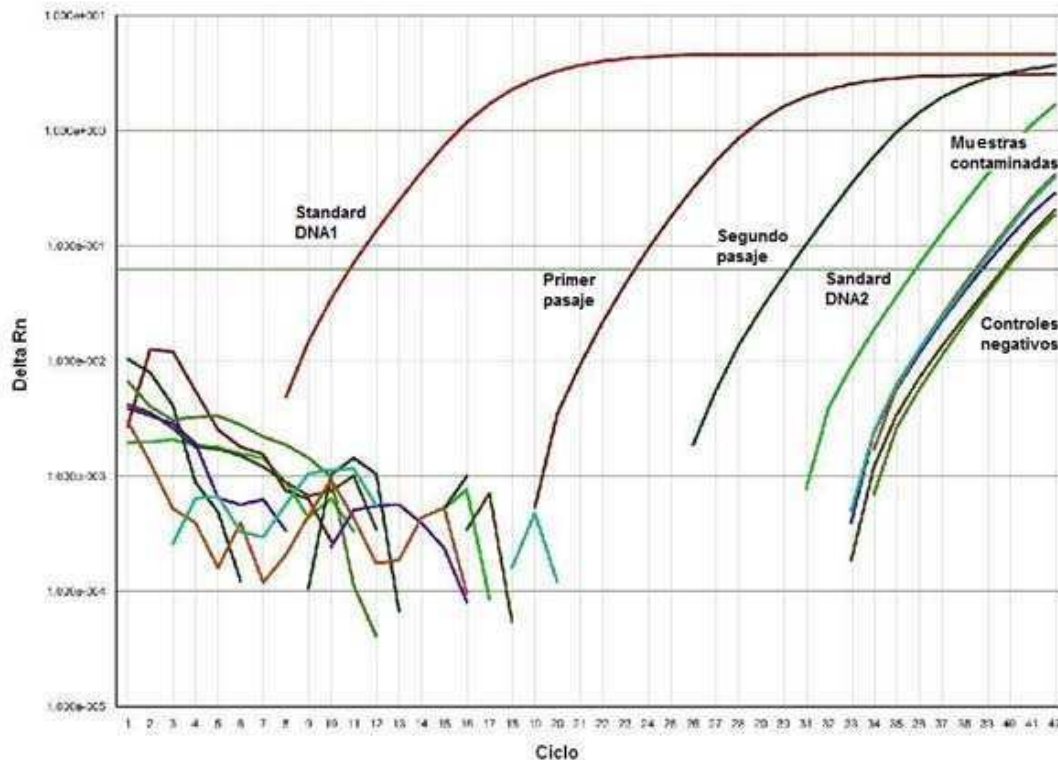


Figura 4.5.4. Real time PCR de la muestras de los 2 primeros pasajes post transfección con ARN transcritto de pK-VFA/O1/Cam. Estándar ADN1: Muestra con 5ng/ μ l de ADN plasmidico pK-VFA/O1/Cam. Estándar ADN2: Dilución de 1/1.000.000 del estándar 1. Controles negativos: ADNc obtenido de la RT de muestras de células sin transfectar. Muestras contaminadas ad hoc: ADNc obtenido de la RT de muestras de células sin transfectar y sometidas a una contaminación intencional con una traza de ADN plasmídico con la secuencia diana. Primer pasaje VFA/O/P1: ADNc obtenido de la RT de la muestra correspondiente al P1 post transfección con ARN. Segundo pasaje (VFA/O/P2): ADNc obtenido de la RT de la muestra correspondiente al P2 en células de la transfección con ARN.

Nuevamente se detectó ARN viral en los dos primeros pasajes posteriores a la transfección. Se realizó también en este caso una prueba semicuantitativa mediante Real-Time PCR para observar si la cantidad de ARN detectado está presente en las muestras en cantidades coherentes con una contaminación o en mayores cantidades. Si bien la técnica no estaba ajustada para estimar número de copias, puede observarse que los niveles de ARN viral detectados en los dos primeros pasajes (VFA/O/P1 y VFA/O/P2) son muy superiores a los observados en una contaminación intencional con ADN plasmídico realizada en una muestra (Fig. 4.5.4).

Por último, se evaluó si lo observado se mantiene al realizar repiques de las células sin lisar (despegadas intactas) que previamente hayan sido transfectadas con el ARN símil genómico y el reactivo DEMRIE-C. Para ello las células BHK-21 transfectadas se tripsinizaron y

se plaquearon en una dilución al tercio. Se mantuvieron con medio GMEM 10% FBS y luego que la monocapa alcanzó la confluencia (48h después) se repitió el procedimiento. En este nuevo experimento tampoco se observó ECP, pero se recobró ARN viral de las células transfectadas y de los 2 primeros repiques, como se muestra en la Fig. 4.5.5.

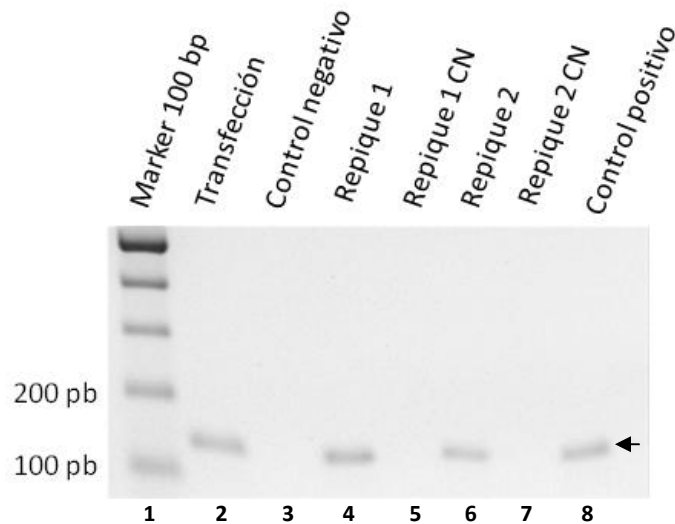


Figura 4.5.5. RT-PCR de la transfección con ARN transcritto de pK-VFA/O1/Cam, y los dos primeros repiques de células sin lisar. Las células se despegaron con tripsina. Calle 1: marcadores de PM. Calles 2, 4 y 6: células transfectadas y sus repiques 1 y 2. Calles 3, 5 y 7: controles negativos tratados solo con lipofectamina. Calle 8: control positivo de PCR usando un ADN plasmídico como templado

4.6. Re-secuenciación del clon completo.

Con el fin de identificar alteraciones no detectadas inicialmente en la secuencia que pudieran explicar el comportamiento observado, se decidió secuenciar nuevamente el ADN del clon *full length*.

4.6.1 Secuenciación por “*primer walking*”.

Para ordenar el proceso y acelerar los tiempos se realizó el *primer walking* por separado de tres zonas solapadas del clon. Una vez obtenidas las secuencias iniciales de cada uno de ellos, se utilizaron como base para sintetizar nuevos *primers* para continuar sucesivamente con el proceso, hasta completar cada segmento. Un diagrama de este procedimiento muestra en la Fig. 4.6.1. Los *primers* utilizados se enumeran en la Tabla 4.6.1

Tabla 4.6.1. Primers utilizados para la secuenciación por primer walking del clon completo

Denominación	Secuencia (5'-3')
pkf4F	CCAGCAACGCGCCTTTTTACGGT
L1r	AGTTCAACCCAGTGTCCCATTAG
C_1_L1r-1	TGAGGGAAAAGTGTGAGCTG
pkf4F-F	CCCCCTAGGTTTTACCGTCA
pkf4F-R	GAAAACGGGCAAACTGTGT
pkf4F-F-1	CGCTTTGGTACAGGCTATCAG
L2f	CGAAGGCGGTTACATGATTGCCTA
L2r	TGAGGGGTCGGAGTTCCTCTTTGAT
C_L2f-1	TGCAGGTACAGCAGAAATGC
C_L2r-1	GGTGAAGTGGGTGGAAATTG
F5200	TGGCAATGTTTCAATACGACTG
pkf4_R400	GACGGGACGGCGCTTTGTTGA
C_Reta_F5200-1	GGTCCGATGGAGAGACAGAA
C_pkf4_R400-1	CTTTGAGGCCATCACAGTT

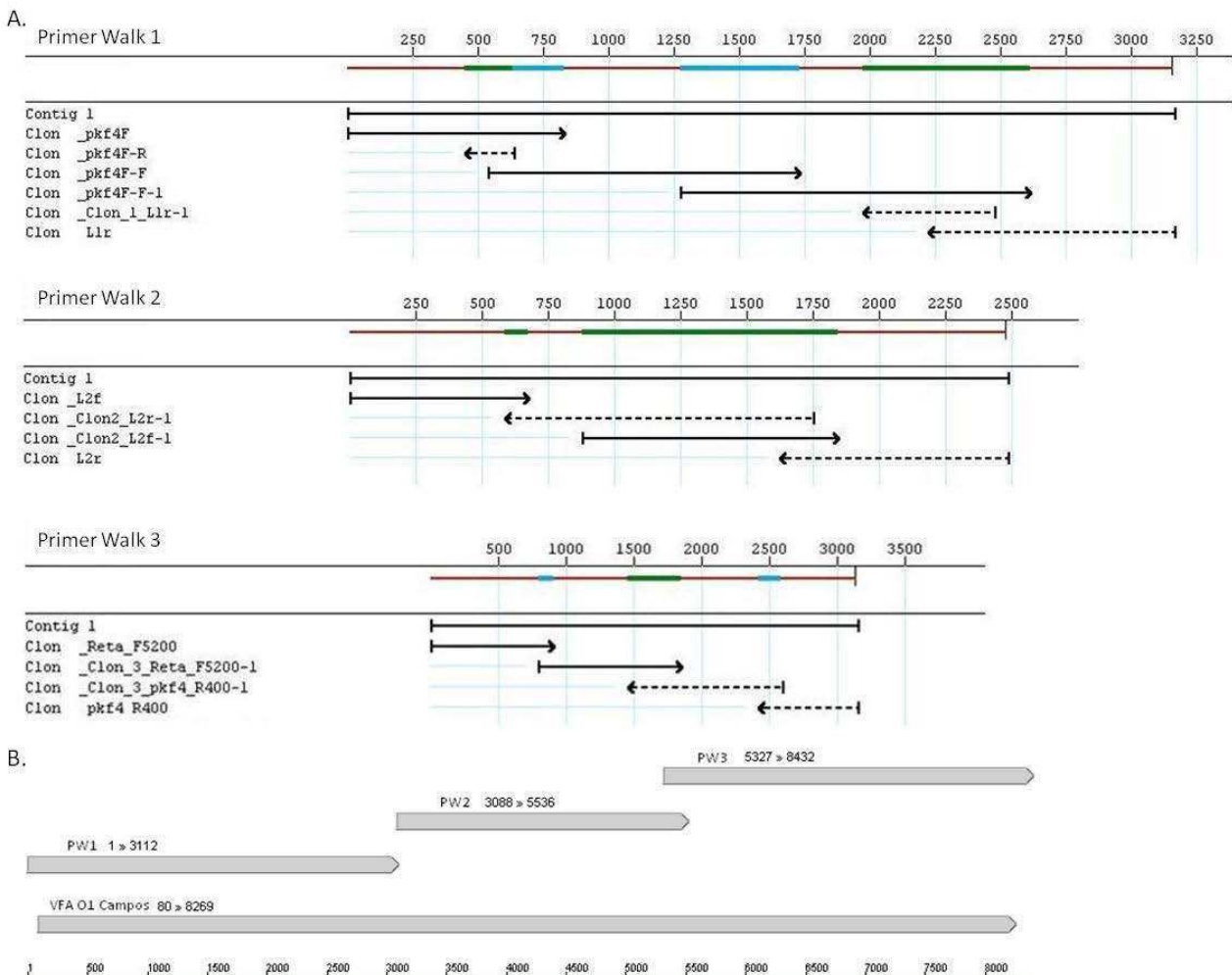


Figura 4.6.1. Esquema de la secuenciación por primer walking. (A) Diagrama mostrando la cobertura de las tres zonas en que se dividió la secuenciación del clon. **(B)** Esquema del solapamiento entre las tres zonas y su ubicación en el clon.

4.6.2. Análisis de la nueva secuenciación.

Al comparar la secuencia obtenida con la de la cepa O1/Campos reportada en la base de datos (AJ320488) y con la nueva secuenciación del ADN del clon obtenida, se detectó la delección de una guanosina en la posición 4120 y la inserción de una adenosina en la posición 6810, ambas dentro del ORF, como puede verse en la Fig. 4.6.2A. En el caso de la delección G4120 la alteración se observó en la secuencia de los dos fragmentos que cubren el área (región solapada), mientras que en el caso de la A6810 la alteración se observó en solo uno de los segmentos que solapan en esa zona. Para confirmar estos cambios se secuenciaron por duplicado ambas zonas nuevamente con nuevos *primers* diseñados para tal fin (rev4665 y forw6629, Anexo I).

El análisis de las nuevas secuencias obtenidas verificó la presencia de la delección G4120 y la ausencia de la inserción A6810 (Fig. 4.6.2B)

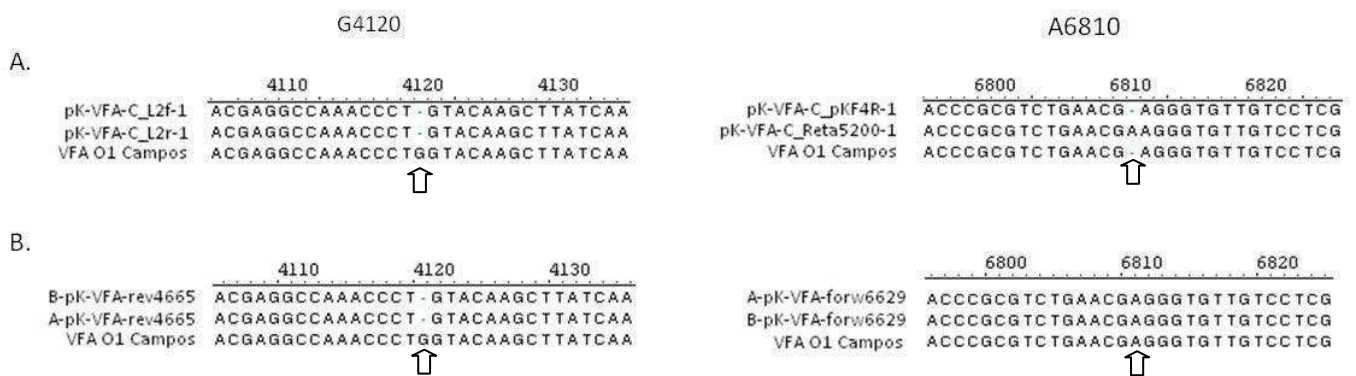


Figura 4.6.2. Alineamiento de secuencias parciales obtenidas por *primer walking* con la de la cepa O1/Campos (AJ320488). (A) Alineamiento de las secuencias obtenida con los *primers* C-L2f-1 y C-L2R-1 en la zona donde se encontró la alteración G4120, y con los *primers* C_pKF4R-1 y C_Reta5200-1 donde se encontró la alteración A6810 (posibles inserciones o delecciones). **(B)** Alineamiento de las nuevas secuencias obtenidas con el *primer* rev4665 (dos secuenciaciones independientes) para G4120, y con el *primer* forw6629 (dos secuenciaciones independientes) para A6810.

4.7.1. Reemplazo de la zona del ADN que comprende la delección G4120.

Con el fin de corregir la delección G4120 se reemplazó en el clon *full length* una zona que comprende la delección). Con este fin se amplificó nuevamente por RT-PCR el segmento L2, utilizando como templado un remanente de ARN genómico viral de y las enzimas GoScript (Promega) y Pfx 50 (Invirogen), respectivamente.

El clon *full length* (pK-VFA/O1/Cam) y el producto de PCR fueron digeridos con las ERs XmaI y EcoRI (región genómica 3766-5427), el ADN del clon se trató con fosfatasa alcalina y ambos ADNs fueron purificados. En la posterior ligación se utilizó una cantidad mínima del

plásmido (15 ng por reacción) para reducir el religado del mismo e identificar más fácilmente los clones positivos. Posteriormente se secuenciaron los ADNs para identificar los clones que efectivamente incorporaron el segmento suplantado (*primer rev4665*).

4.7.2 Secuenciación completa del clon modificado.

Dado que, por lo observado previamente el clon podría ser inestable en el sistema de bacterias y plásmido utilizados, se realizó nuevamente una secuenciación completa del clon modificado, utilizando los *primers* que figuran en la Tabla 4.7.1.

Tabla 4.7.1. *Primers* utilizados para la nueva secuenciación completa.

Denominación	Secuencia (5'-3')
pkf4F	CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGT
L1r	AGTTCAACCCAGTGTCCATTAG
AflII-For	CGCGAGGTGTGCATGGTGGATGGTA
1445Rev	ATCCACCATGCACACCTCGCT
rel-r1806	TTAGAGCCTCCACTGATTGCGT
L2f	CGAAGGCGCGTTACATGATTGCCTA
L2r	TGAGGGGTTCGGAGTTCCTCTTTGAT
Rev4665	CTGGGGCGACCACTTTACACA
Clon2_L2f-1	TGCAGGTACAGCAGAAATGC
F5200	TGGCAATGTTTCAATACGACTG
pkf4_R400	GACGGGACGGCGGCTTTGTTGA
3CRev	TAATGGATCCTACTCGTGGTGTGGTTCGGGGTCAAT
forw6226	GCAGAGCCATGACAGACAGT
forw6629	CCAGGTCCATGCTTCTTA

Un esquema del ensamblado de las partes para reconstruir la secuencia completa del clon se presenta en la Fig. 4.7.1. Al igual que en los casos anteriores, se analizaron los electroferogramas, y se eliminaron los extremos de las secuencias.

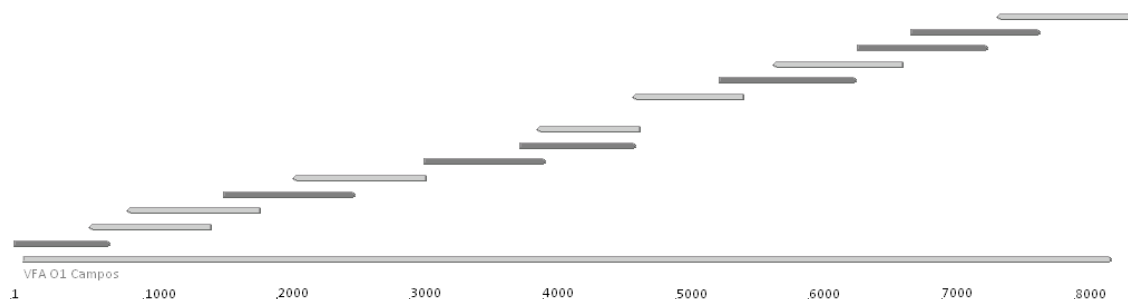


Figura 4.7.1. Diagrama del solapamiento de las secuencias del clon para la reconstrucción de la secuencia completa. Los segmentos en gris oscuro representan secuencias en el sentido 5'-3' de la secuencia viral, los restantes son secuencias correspondientes a la hebra complementaria.

4.7.3 Análisis de la secuencia del clon modificado.

El análisis de la secuencia verificó la ausencia de la delección observada anteriormente. Por otro lado, no se encontraron nuevas inserciones o deleciones, ni codones de terminación prematuros.

En la región remplazada (segmento 3766-5427) se encontraron 5 mutaciones que producen un cambio de aa con respecto a la secuencia reportada de VFA O1/Campos. Todas, salvo una de ellas, fueron encontradas también en distintos aislamientos del serotipo O1.

4.7.4 Transfección ARNs transcriptops del clon completo de VFA O1/Campos modificado y evaluación de su capacidad infectiva.

Al igual que en las oportunidades anteriores se linealizó el ADN de el clon con la ER EcoRV, se purificó y se realizó la transcripción *in vitro* con el kit comercial. MAXIScript (Ambion). Posteriormente se purificó el ARN con el kit SV total RNA isolation system (Promega) y se cuantificó el ARN en el equipo *Nanodrop*. La transfección se realizó utilizando DMRIE-C (Invitrogen) como agente transfectante.

Tanto a las 24 hs como a las 48 hs no se pudo observar ECP en las células transfectadas, las cuales no mostraron diferencias apreciables con el control de células sin transfectar o incubadas solo con DMRIE-C sin ARN. Se realizaron dos pasajes más utilizando el lisado clarificado de las células transfectadas y sus controles sin observarse ECP dentro de las 48hs.

Llegado este punto se decidió analizar en mayor profundidad las mutaciones presentes en el clon para identificar si alguna de ellas podría ser la causa de la ausencia de virus infeccioso.

4.8. Re-análisis de los cambios en la secuencia de pK-VFA/O1/Cam en relación con la secuencia reportada AJ320488.

Se analizó la secuencia en profundidad con el fin de identificar la o las mutaciones que pudieran explicar este comportamiento. Las mutaciones enumeradas a continuación corresponden a las diferencias encontradas entre el clon pK-VFA/O1/Cam y VFA O1/Campos (AJ320488).

4.8.1. Zonas no codificantes.

Dado que el análisis de las secuencias no codificantes (NC) es más complejo que el análisis de la zona codificante se tomó como criterio basar el análisis en los resultados obtenidos en un estudio de genómica de VFA publicado previamente en por Carrillo y cols. (2005), donde se identifican zonas invariables o de alto nivel de conservación, para estudiar si las mutaciones presentes en pK-VFA/O1/Cam están dentro de alguna zona o motivo conservado.

4.8.1.1. Región 5' NC, fragmento S.

El fragmento S del extremo 5' no codificante posee un tamaño variable de entre 322 y 373 pb (según el serotipo y aislamiento) y se desconoce su contribución específica en el ciclo viral (Carrillo y cols., 2005). En dicho fragmento se observa una alta variabilidad y si bien se predice en un gran número de aislamientos una estructura secundaria de un único *stem-loop* previo al poli(C) (Fig. 4.8.1A), en otros aislamientos se encontraron estructuras secundarias diferentes, sin que esto implicara un comportamiento diferencial.

Ninguna de las 7 mutaciones observadas en esta zona en el clon pK-VFA/O1/Cam ocupa una posición altamente conservada (Fig. 4.8.2).

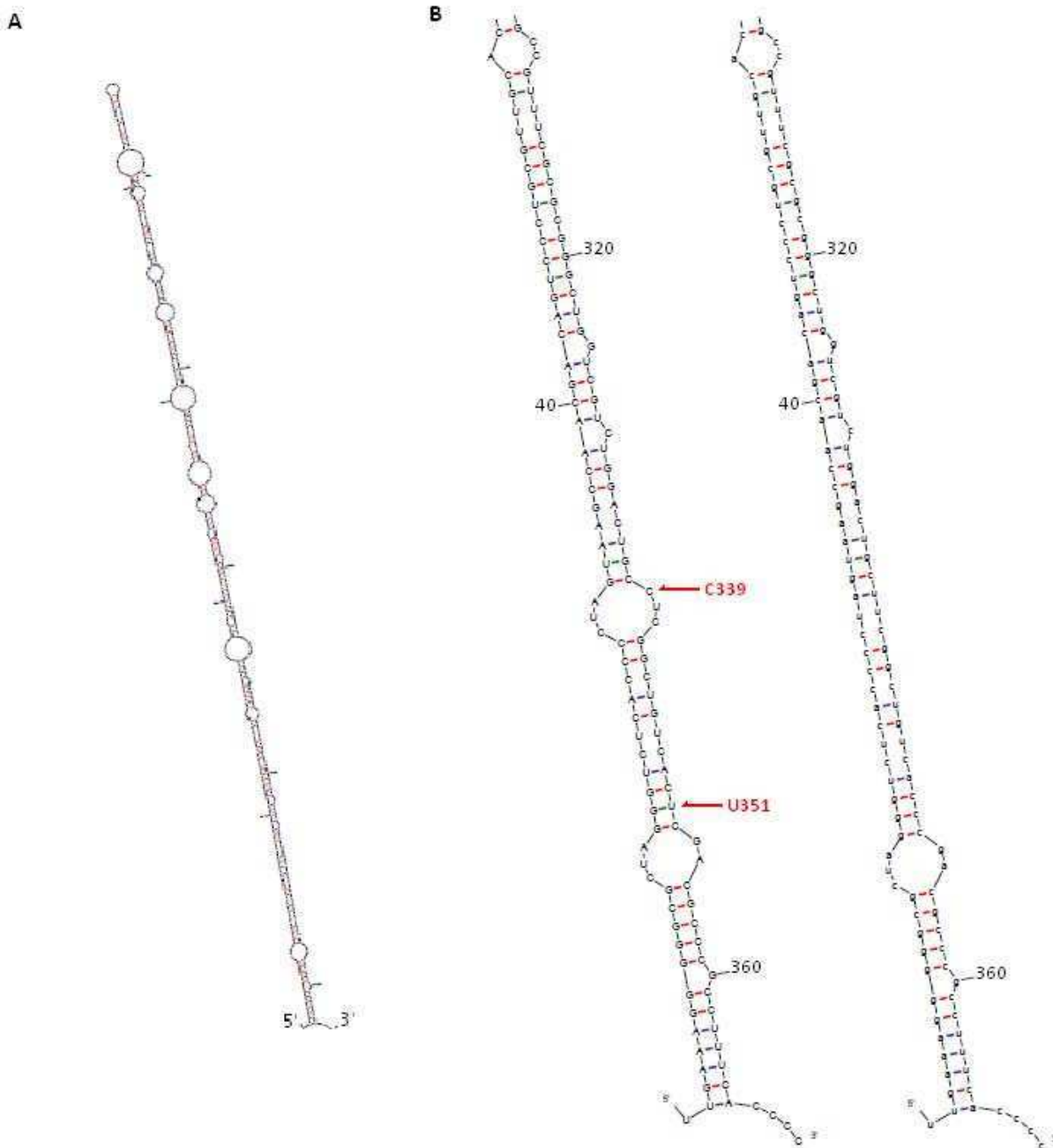


Figura 4.8.1A-B Estructura secundaria del segmento S de la región 5' NC. **(A)** Representación de la estructura secundaria del segmento S completo. **(B)** Estructura secundaria de la región S de pK-VFA/O1/Cam a la izquierda y de VFA O1/Campos a la derecha. Las diferencias a nivel nucleotídico están marcadas sobre la figura de pK-VFA/O1/Cam.

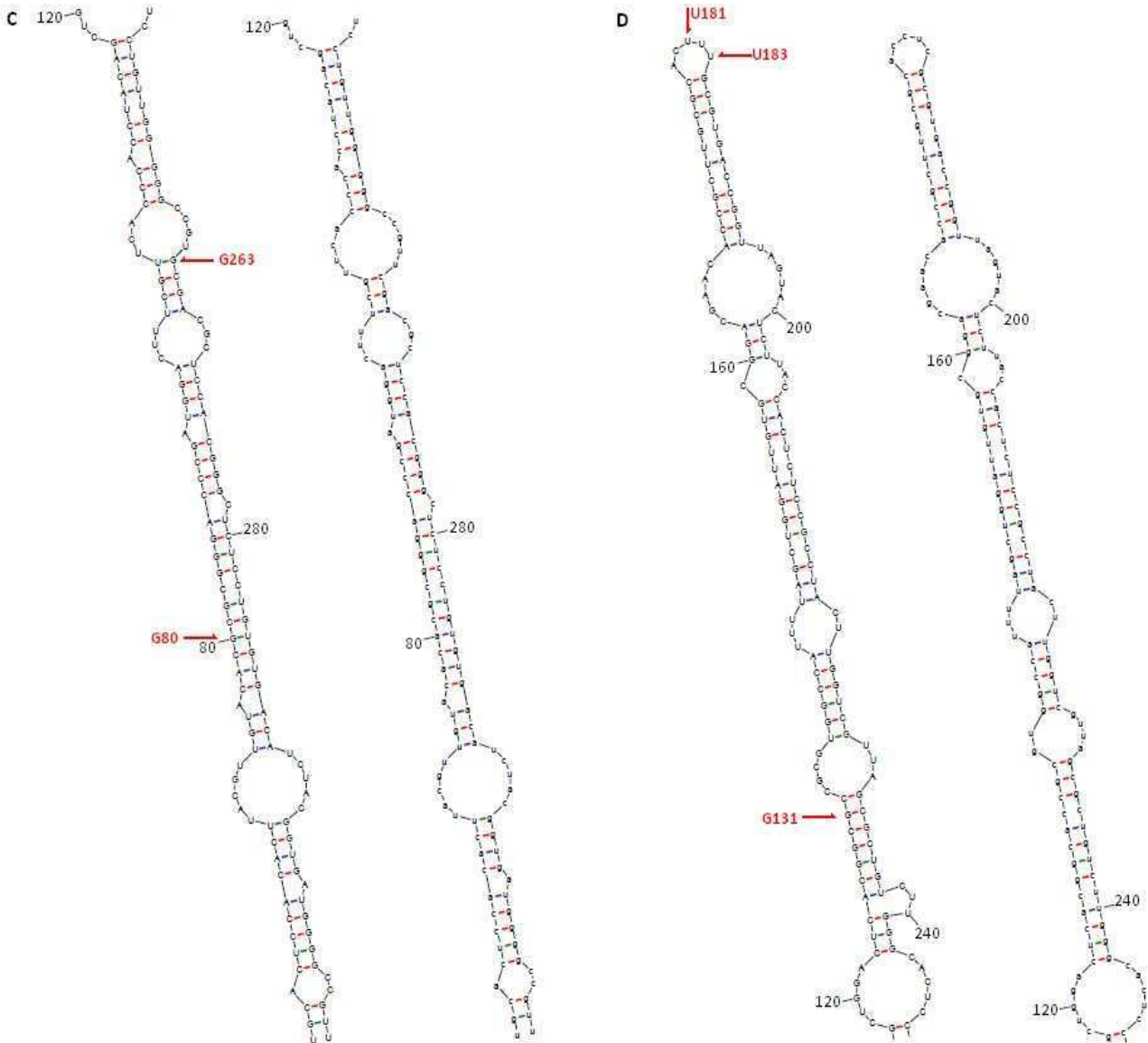


Figura 4.8.1C-D. Estructura secundaria del segmento S de la región 5' NC (continuada). Estructura secundaria de la región S de pK-VFA/O1/Cam a la izquierda y de VFA O1/Campos a la derecha tanto en C como en D. Las diferencias a nivel nucleotídico están marcadas sobre la figura de pK-VFA/O1/Cam.

```

TTGAAAGGGGGCGCTAGGGTCTACCCCTAGTAAGCCAACGACAGTCCCTGCGTTGCACTCCACACTTA
CGTTGTACACGCGCGGGACCCGATGGACTTTCGTTACCCACCTACAGCTGGACTCACGGCGCCGCGT
GGCCATTTTAGCTGGATTGTGCGGACGAACACCGCTTGCACACTTGGCGTGACCGGTTAGTACTCTTAC
CACTCTCCGCTACTTGGTCGTTAGCGCTGTCTTGGGCACTCCTGTTGGGGCCGTGCGACGCTCCACG
GGCTCTCCTGTGTGACATCTACGGTGATGGGGCCGTTTCGCGCGGGCTGGTGTCTGGACTGCCCTCGG
CTGTCACTCGACGCCGCTTTCACCCCCCCCCCCCCCCCCC
    
```

Figura 4.8.2 Secuencia del fragmento S de pK-VFA/O1/Cam. Las diferencias con VFA O1/Campos se encuentran en **negrita y subrayadas**. Las posiciones conservadas (descriptas por Carrillo y cols., 2005) están **sombreadas**.

Se realizó la predicción de la estructura secundaria de la secuencia de VFA/O1/Campos y la de pK-VFA/O1/Cam utilizando el software Mfold de acceso libre (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>), correspondiente a la publicación Zuker, M., 2003. La comparación de dichas estructuras, se presenta en la Fig. 4.8.1 (paneles B, C y D), donde se indican las mutaciones observadas.

Como resumen se puede destacar que:

G131: Modifica la estructura de la zona desapareada circundante a la misma, y como se observa en la Fig. 4.16.2 es una zona que no posee nucleótidos conservados. Como producto de dicho cambio la C234 (nucleótido conservado que estaba desapareado) pasa a estar apareado y los nucleótidos C238 y U239 (no están conservados) quedan desapareados.

U181 y U183: Están ubicadas en el *loop* terminal de la estructura *stem-loop*. En el estudio mencionado no se reporta ningún tipo de secuencia consenso ni nucleótidos conservados en esta estructura.

G263: El nucleótido U103 que estaba desapareado pasa a estar apareado. No modifica el estado de ningún nucleótido conservado.

C339: Genera un tracto de tres nucleótidos desapareados donde había solo dos. La A30 que ahora se encuentra desapareada no es un nucleótido conservado.

Ninguna de estas mutaciones muestra una perturbación importante en la estructura secundaria, ni ocupa posiciones conservadas.

4.8.1.2. Región 5' NC, fragmento L.

El fragmento que llamamos L abarca la zona que se encuentra entre el tracto de poli(C) y el codón de comienzo de la zona codificante. El mismo está conformado por dos zonas diferenciadas, los *pseudoknots* y el IRES.

4.8.1.3 Región de pseudoknots.

Los *pseudoknots* abarcan los primeros 172 pb río abajo del poli(C), y es una zona de gran variabilidad en el cual se han encontrado deleciones e inserciones que no afectan el ciclo viral de forma apreciable. Adicionalmente, no se reportan nucleótidos con alto grado de conservación en esta zona (Carrillo y cols., 2005). El clon pK-VFA/O1/Cam no presenta mutaciones en este fragmento.

4.8.1.4. Región IRES.

El IRES posee 5 dominios diferenciados, en los cuales se observan numerosas secuencias consenso necesarias para su correcto funcionamiento. Para analizar si las mutaciones ubicadas en esta región ocupan alguna de las posiciones conservadas se realizó un alineamiento de la secuencia del clon con la secuencia consenso obtenida en el estudio de genómica anteriormente mencionado (Fig. 4.8.3).

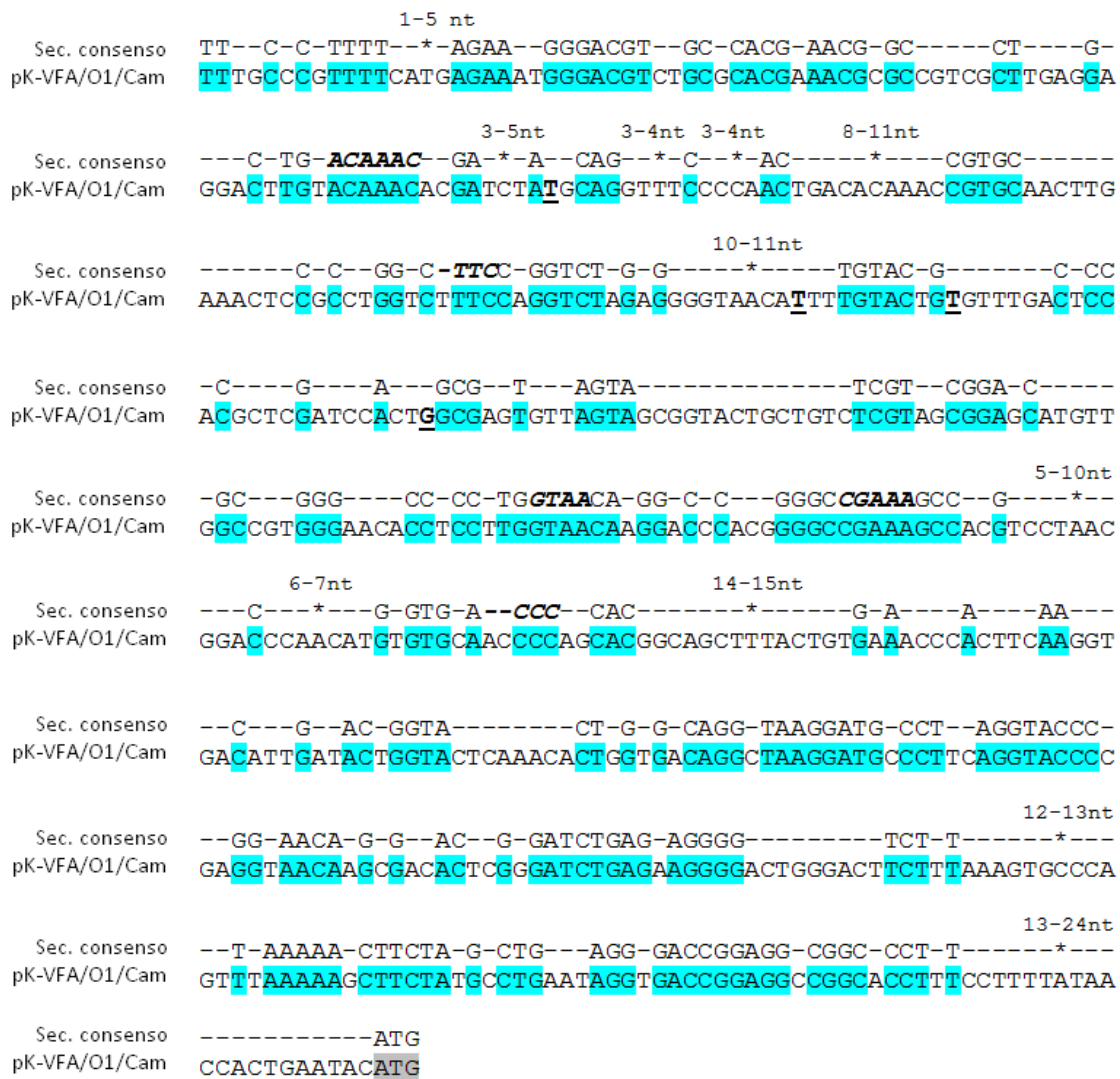
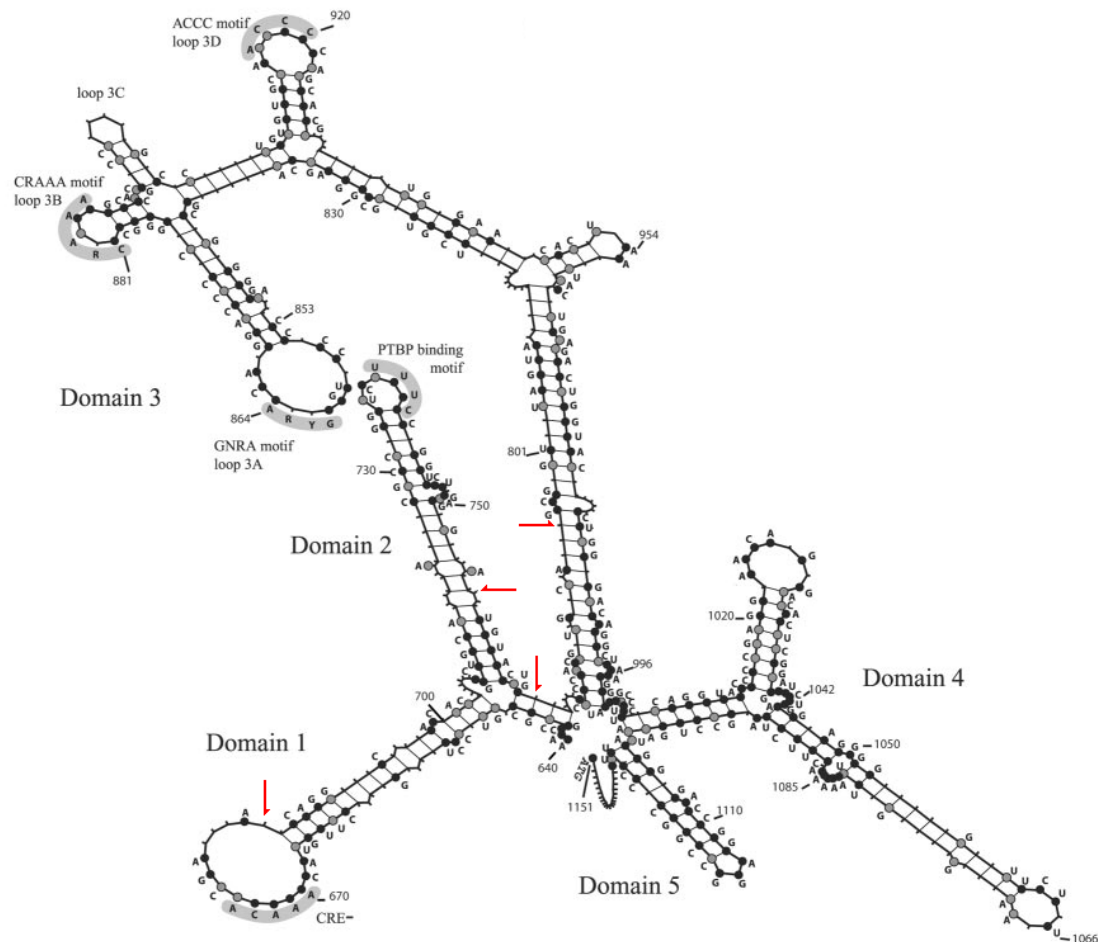


Figura 4.8.3 Alineamiento de la secuencia de la zona del IRES de pK-VFA/O1/Cam con la secuencia consenso. Las diferencias del clon con VFA O1/Campos se encuentran en negrita y subrayadas. Los asteriscos representan lugares donde se han encontrado deleciones o inserciones. Los números sobre los asteriscos indican el número máximo y mínimo de nucleótidos que abarcan estas zonas conservadas. Las zonas conservadas han sido resaltadas en azul en la secuencia del clon

Como puede observarse, ninguna de las 4 mutaciones que posee el clon en esta zona ocupa posiciones conservadas.

Adicionalmente identificamos la estructura secundaria del IRES (Fig. 4.8.4) con estas mutaciones. Para mayor claridad, esto se realizó sobre el gráfico de la estructura secundaria consenso que se informa en Carrillo y cols. (2005).



C.Carrillo et.al. 2005

Figura 4.8.4 Estructura secundaria del IRES donde se identifica la posición de las mutaciones encontradas en pK-VFA/O1/Cam.

4.8.1.5. Región 3' NC.

En la zona 3' no traducible se encontraron 4 mutaciones con respecto a la secuencia de VFA O1/Campos, estas son: G8117, U8128, G8158 y A8166.

El alineamiento de la secuencia consenso (publicada en el trabajo antes mencionado) y pK-VFA/O1/Cam (Fig. 4.8.5) indica que ninguna de las 4 mutaciones presentes se ubica en una

posición o motivo conservado. Adicionalmente puede verse que el primer *stem-loop* (donde se ubican las mutaciones G8117 y U8128) no se encuentra conservado y es una zona donde se han encontrado un gran número de deleciones (Carrillo y cols., 2005).

Con respecto a las dos mutaciones restantes (G8158 y A8166), se realizó comparación de la estructura secundaria del 3'UTR de VFA O1/Campos y del clon con el software Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) donde puede verse que la estructura del segundo *stem-loop* se ve afectada por las mutaciones presentes. Cabe destacar que el aislamiento O/Uruguay iso51 (AY593837) posee un segundo *stem-loop* exactamente igual al de pK-VFA/O1/Cam (Fig. 4.8.6).

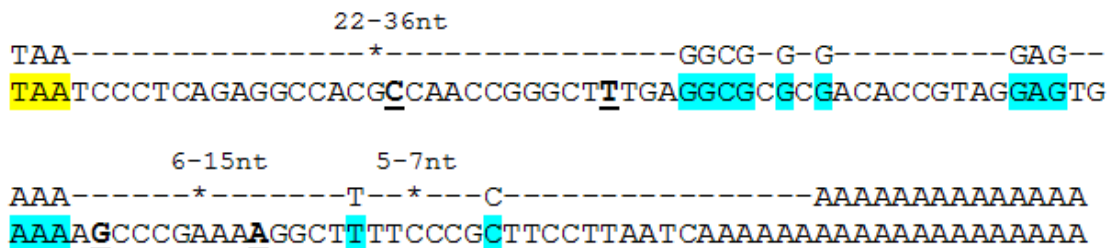


Figura 4.8.5. Alineamiento de la secuencia 3' NC de pK-VFA/O1/Cam con la secuencia consenso. Las diferencias del clon con VFA O1/Campos se encuentran en negrita y subrayadas. Los asteriscos representan lugares donde se han encontrado deleciones o inserciones. Los números sobre los asteriscos indican el número máximo y mínimo de nucleótidos que abarcan estas zonas no conservadas. Las zonas conservadas han sido resaltadas en azul en la secuencia del clon.

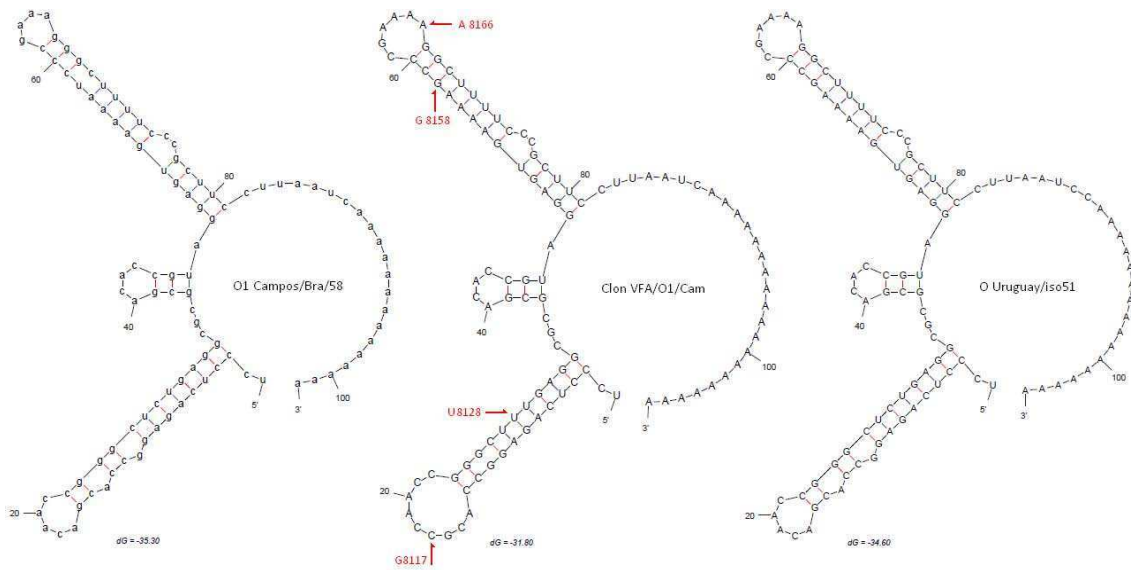


Figura 4.8.6. Estructura secundaria de las zonas 3' NC. Estructura secundaria de las zonas 3' NC de VFA O1/Campos (izquierda), pK-VFA/O1/Cam (centro) y VFA O/Uruguay/iso51. Las diferencias entre pK-VFA/O1/Cam y VFA O1/Campos se encuentran marcadas en la estructura secundaria de pK-VFA/O1/Cam

Dado que dos de las mutaciones se ubican en una zona hipervariable, y las dos restantes se encuentran representadas en un mismo aislamiento, generando una estructura secundaria similar se asume que estas mutaciones tienen una baja probabilidad de ser las responsables del fenotipo anómalo del clon.

4.8.2. Región codificante.

Para analizar la región codificante se produjo la traducción de la misma y se realizó el alineamiento con 288 secuencias proteicas de VFA (descargadas de la bases de datos de NCBI) con la aplicación *AlignX* del software *Vector NTI 8*. De estas secuencias 17 corresponden solo al segmento de las proteínas estructurales, y las 271 restantes son secuencias de la poliproteína completa. La lista con los números de acceso de las secuencias utilizadas se encuentra en el Anexo III.

En este análisis se identificaron las diferencias entre el clon pK-VFA/O1/Cam y VFA O1/Campos (AJ320488) y posteriormente se verificó que aa ocupan esa posición en los demás aislamientos analizados. El resultado de dicho análisis se presenta en la Tabla 4.8.1.

Como puede observarse, seis de las mutaciones encontradas generan un cambio de aa que no se encuentra representado en ninguno de los aislamientos utilizados para el alineamiento, dichos aa son: D46, T397, S603, F1184, P1947 y R2322.

Tabla 4.8.1. Cambios de aa en la región codificante

Aminoácido	Posición en la poliproteína	Aminoácidos presentes en esa posición en otros aislamientos
D	46	N
T	397	A
R	416	KCHGDQWRS
H	560	HRDNCMVT
D	564	DGTRVEN
I	569	TKSVAREI
S	603	TA
A	737	TASV
E	765	KCHLRQNE
K	857	ERVNTDKSA
A	868	SLVGAREDTI
I	1056	VI
A	1074	VA
V	1081	VIALSAT
F	1184	C
T	1236	TAS
S	1350	NSE
A	1363	TAP
I	1487	VIA
V	1559	AVTSMP
P	1947	L
R	2322	L

Una vez identificadas estas mutaciones se ubicaron las posiciones que ocupan en las proteínas virales ya procesadas y, haciendo uso nuevamente de la información publicada en Carrillo y cols. (2005), se buscó su ubicación en posiciones descritas como conservadas. En la Fig. 4.8.7 se muestra el alineamiento de la secuencia consenso comparada con la secuencia de VFA/O1/Campos y la del clon pK-VFA/O1/Cam para la zona circundante a cada mutación.

	Lpro N46D		VP2 A111T		VP3 T98S
Consenso	SRPN---NCW	Consenso	GWD--V-A---QFN	Consenso	G-A-Y--QY-G
O1/Campos	SRPNNHDNCW	O1/Campos	GWDVEVTAVGNQFN	O1/Campos	GLAQYTTQYSG
pK-VFA/O1/Cam	SRP D NHDNCW	pK-VFA/O1/Cam	GWDVEVT I VGNQFN GV S	pK-VFA/O1/Cam	GLAQY S QYSG
	2C C76F		3D L85P		3D L460R
Consenso	R--CLK-GN	Consenso	CAADYAS-LH--LG	Consenso	PS-RSLYLRW-NA
O1/Campos	RQACLKSGN	O1/Campos	CAADYASRLHSVLG	O1/Campos	PSYRSLYLRWVNA
pK-VFA/O1/Cam	RQA F LKSGN E	pK-VFA/O1/Cam	CAADYAS R HSVLG	pK-VFA/O1/Cam	PSYRSLY R RWVNA SA DP

Figura 4.8.7 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del clon, de VFA O1/Campos y de la secuencia consenso de Carrillo y cols. (2005). Las mutaciones se encuentran resaltadas con azul en la secuencia de pK-VFA/O1/Cam. Los aa colocados debajo de los alineamientos indican posiciones que: si bien fueron reportadas como invariables en el artículo citado, se encontró variabilidad en nuestro análisis con 288 secuencias.

Cabe destacar que todas ellas, salvo una, se ubican en posiciones reportadas como conservadas, salvo T98S en VP3, posición puede ser ocupada por dos aa diferentes.

Un dato interesante surgido de esta comparación es que en nuestro análisis encontramos otros aislamientos que poseen aa distintos al consenso en posiciones que el estudio de Carrillo y cols. (2005) describe como invariables (aa colocados debajo de los alineamientos de la Fig. 4.8.7).

Para obtener información que nos permita discernir que mutaciones tienen mayor probabilidad de influir en el fenotipo observado en pK-VFA/O1/Cam, se estudiaron las cristalografías de rayos X de las proteínas L^{pro}, VP2 y 3D con el fin de realizar modelados moleculares con las versiones mutantes de estas proteínas.

4.9 Modelado de proteínas.

Para poder inferir si alguna de las mutaciones encontradas en el clon completo altera la estructura de las proteínas codificadas se realizaron los modelados de las mismas. Dicho procedimiento (si bien carece de valor predictivo) es una herramienta de gran utilidad y amplio uso al momento de seleccionar las mutaciones a realizar en experimentos de mutagénesis dirigida (Dunbrack y cols., 1993; Xiang y cols., 2001; Feyfant y cols., 2007).

Para este análisis inicialmente se realizó un alineamiento de las secuencias proteicas del clon con las secuencias existentes de cepas del VFA en la base de datos de proteína cristalizadas (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). En cada caso se seleccionó para el modelado la que poseía el mayor grado de identidad. Una vez obtenida la información cristalográfica de la misma se realizó el modelado de las proteínas. Tanto la determinación de la molécula molde más adecuada, como el modelado se realizaron con los programas integrados en la plataforma SWISS-MODEL Workspace (Guex y cols., 1997; Schwede y cols., 2003 y Arnold y cols., 2006). Posteriormente se evaluó visualmente la localización de la mutación y la existencia de una alteración en la estructura secundaria o terciaria en la zona en particular donde se encuentra el cambio de aminoácido; lo cual, si bien no posee valor predictivo a nivel de la estructura terciaria, es un indicativo del efecto que podría producir la sustitución en estudio. Finalmente se analizó con el software QMEAN (Benkert y cols., 2011) la similitud entre las estructuras terciarias de ambas versiones de la proteína de forma global.

El software QMEAN realiza un análisis de distintos parámetros para determinar el ajuste de la secuencia a la estructura de la proteína modelada, analizando geometría local, ángulos de enlaces peptídicos en grupos de tres aminoácidos, solvatación, y potenciales de interacción dependientes de la distancias entre átomos (entre otros parámetros). De esta forma el valor de QMEAN4 informado por el programa indica la calidad del ajuste que posee la estructura obtenida. Un ajuste adecuado corresponde a valores de QMEAN4 en el rango de 0-1.

Adicionalmente el programa calcula otro parámetro, denominado QMEAN *Z-score*, que evalúa distintos parámetros de la estructura modelada y los compara con los derivados de un alto número de estructuras obtenidas por cristalografías de alta resolución. Mayores valores de QMEAN *Z-score* indican una mayor concordancia con características termodinámicas de estructuras cristalizadas, lo que se relaciona con la estabilidad del plegamiento y la interacción con el solvente. Asimismo, este valor se ve afectado si se analizan individualmente cadenas

proteicas que forman parte de un oligómero, ya que las superficies de interacción entre proteínas poseen características diferentes a las que están expuestas al solvente. Valores de QMEAN *Z-score* en el rango de -1 a 1 indican que la estructura obtenida del modelado posee un alto nivel de confiabilidad.

Para cada uno de los casos las tablas con diferentes parámetros calculados y los valores obtenidos de QMEAN4 y QMEAN *Z-score* se presentan en el Anexo IV.

4.9.1 Sustitución N46D en L^{pro}.

El alineamiento de secuencias indicó a la proteína L^{pro} de la cepa de VFA O1/Kaufbeuren (Guarné y cols., 1998) como la más similar, con una identidad del 98.266 % (Nº de acceso en PDB: 1QOL). Cabe aclarar que en dicha publicación se utilizó la versión Lb^{pro} de la proteasa, y que para hacer posible su cristalización se deletaron los últimos 6 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (evitando así la interacción entre el extremo carboxilo terminal de una molécula y el sitio activo de la molécula vecina) y se mutó la cisteína en las posición 51 por una alanina (Guarné y cols., 1998; Kirchweger y cols., 1994). El alineamiento entre ambas proteínas se encuentra en el Anexo IV. Posteriormente se realizó el modelado utilizando el software previamente mencionado.

En la Fig. 4.9.1 se presenta la superposición de la proteína modelada (color celeste) y de la versión utilizada como molde (color gris). Adicionalmente (y considerando la actividad autocatalítica que L^{pro} ejerce tanto en *cis* como en *trans*) se presenta acompañada de otra copia de la molécula utilizada como molde (en color rojo) en la cual se puede apreciar que el extremo carboxilo terminal se acomoda en el surco en el que se encuentra el sitio activo de la proteasa. En la proteína modelada la sustitución N46D se encuentra resaltada en color verde.

En dicha figura puede verse que la estructura secundaria no se encuentra alterada, y que la estructura terciaria solo difiere en un *loop* (en el extremo carboxilo terminal que posee una delección en la molécula utilizada como molde).

El análisis del software QMEAN entrega un valor de QMEAN4 de 0.827 y QMEAN *Z-score* de 0.83, lo que indica que la estructura obtenida del modelado posee un alto grado de ajuste a la secuencia y que se observan parámetros termodinámicos similares a los de gran parte de las proteínas cristalizadas registradas en las bases de datos (análisis de QMEAN *Z-score*), dándole a dicha estructura modelada una confiabilidad alta.

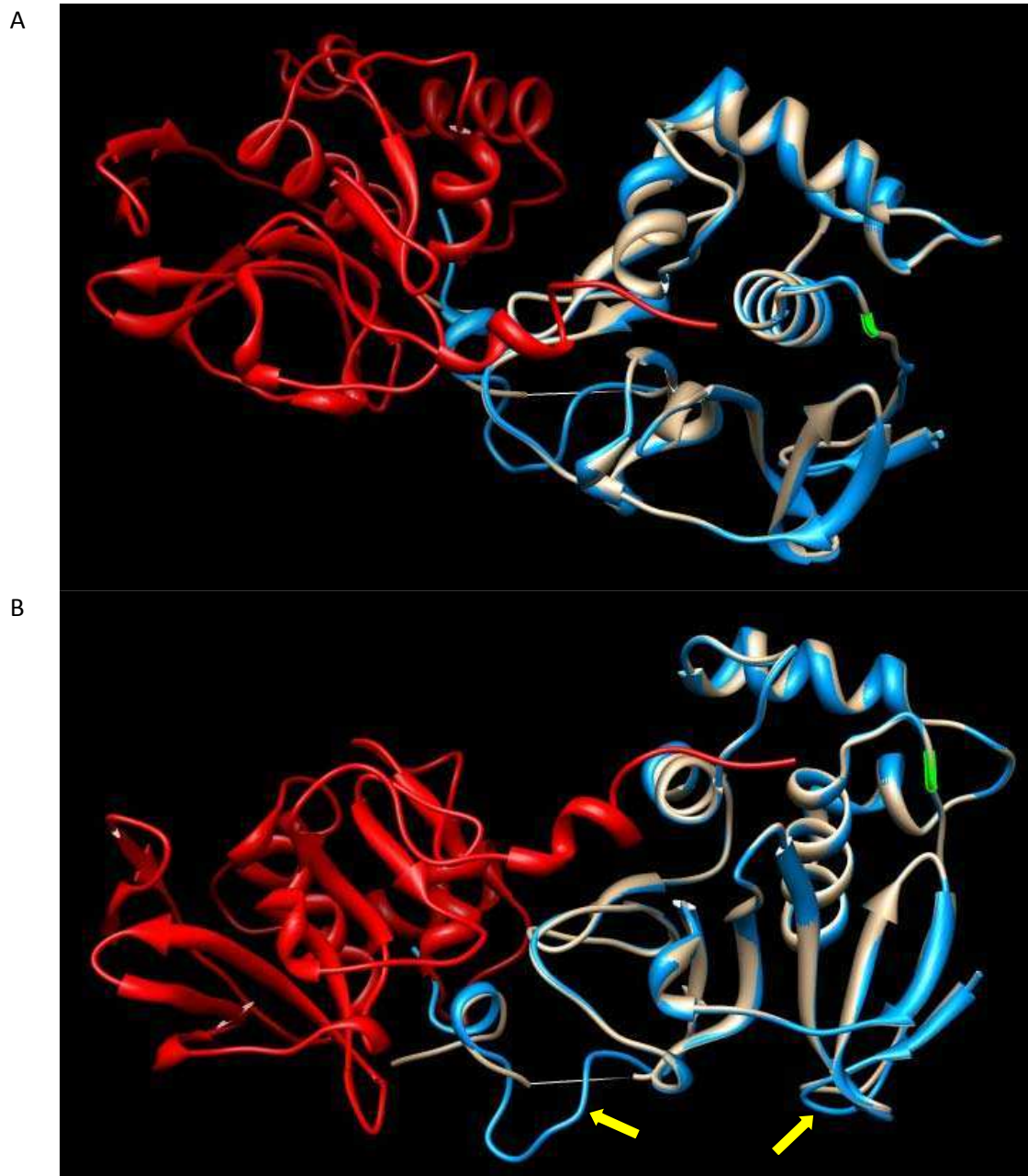


Figura 4.9.1. Modelado de L^{pro}. (A y B) Superposición de la proteína L^{pro} modelada (celeste) y la molécula de L^{pro} utilizada como molde (gris). En rojo se muestra una molécula vecina de L^{pro} con el extremo carboxilo terminal orientado hacia el sitio activo de las moléculas superpuestas. Las flechas amarillas indican las zonas donde la proteína modelada y el molde no coinciden. La ubicación de la sustitución N46D se marca en verde.

Con respecto a la ubicación de la sustitución N46D puede observarse que se encuentra muy próxima al sitio activo, y es parte de los aa que forman el surco donde se acomoda el extremo carboxilo terminal de la molécula diana. En la Fig. 4.9.2 se muestran los aa que forman parte del sitio activo (aa conservados con respecto a la papaína), el ácido aspártico que coordina la histidina del sitio activo y la sustitución N46D.

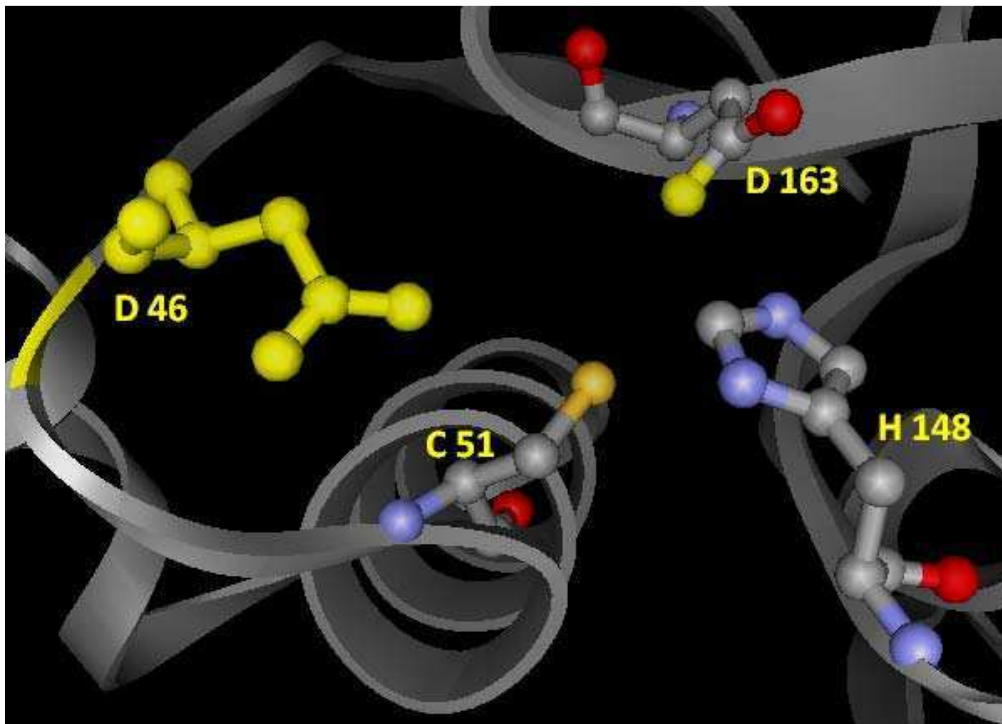


Figura 4.9.2. Sitio activo de L^{pro}. Se muestran los aminoácido catalíticos (C51 y H148), y D163 que coordina a la histidina. Se marca en amarillo la sustitución N46D, que estaría involucrada (junto a otros aa que no se incluyen en el gráfico) en la estabilización del sitio activo.

Dada su ubicación, se postula que la sustitución N46D puede interferir en la actividad de la proteasa o en el reconocimiento de las secuencias diana y de esta forma dificultar tanto el procesamiento de la poliproteína viral como el clivado de factores celulares. Adicionalmente Guarné y cols. (1998) describen a la asparagina 46 (junto a los aa D49, N54 y D164) formando parte de un conjunto de aa que forman una red de puentes de hidrogeno, la cual podría contribuir a la estabilización del sitio activo, y posiblemente formar parte de dicho sitio activo.

Por estas razones se decidió realizar la reversión de la mutación causante de la sustitución N46D en el clon pK-VFA/O1/Cam.

4.9.2 Sustitución A111T en VP2.

En el caso de VP2 el análisis de secuencia con la base de datos de proteínas cristalizadas indicó que la molécula molde más adecuada es la VP2 de la cepa O1 BFS, con un 98.165% de identidad. La cristalografía de dicha proteína fue publicada por Fry y cols. (1999) (Nº de acceso en PDB: 1QQP cadena 2). Dicho alineamiento se presenta en el Anexo IV.

Luego de realizar el modelado y analizar la superposición de la estructura modelada con la utilizada como molde se puede observar que ambas difieren en 5 lugares, 4 de ellos están en *loops* sin estructura secundaria definida y el quinto es la extensión de una estructura

secundaria de lámina β -plegada en el sitio exacto donde se encuentra la sustitución A111T (Fig. 4.9.3).

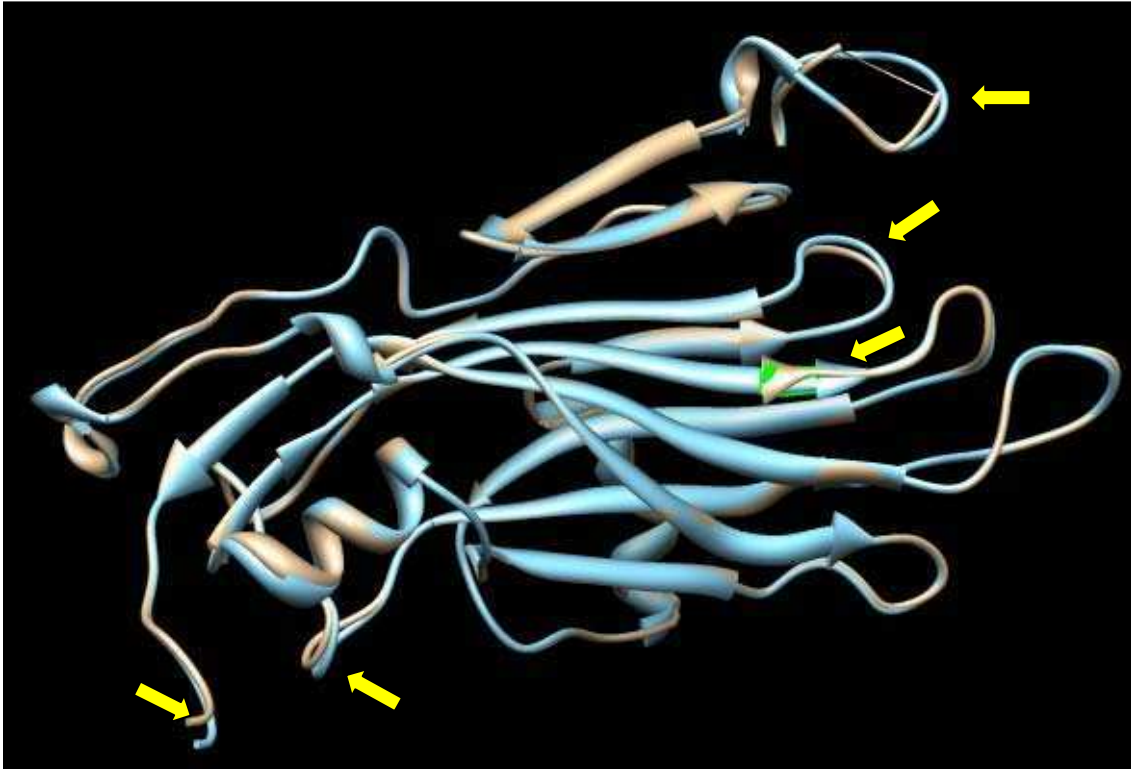


Figura 4.9.3. Modelado de la proteína VP2. Superposición de las estructuras de la cepa O1 BFS (gris) y la obtenida del modelado (celeste). Las flechas amarillas indican los lugares donde se observa una diferencia entre ambas estructuras. La sustitución A111T se marca en color verde, donde se aprecia una variación en la posición donde termina la estructura de lámina β -plegada.

Al realizar un análisis más detallado de esta zona se observó que, mientras que en la proteína VP2 de O1 BFS la estructura secundaria β -plegada finaliza exactamente en el aminoácido A111 (posición en la cual se encuentra la sustitución en estudio), en nuestro caso dicha estructura incluye a los aminoácidos T111 y V112. Adicionalmente puede verse la variación en el posicionamiento de las cadenas laterales de los aminoácidos T110, T111 y V112 (Fig. 4.9.4).

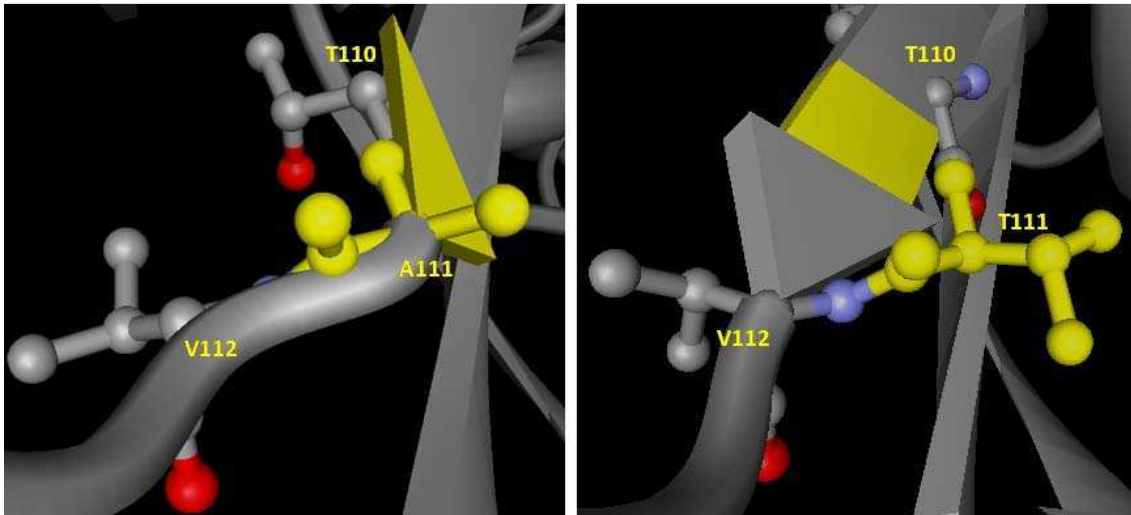


Figura 4.9.4. Detalle de la estructura en la posición 111 de VP2. Estructura de VP2 de O1 BFS (con alanina en la posición 111) en el panel izquierdo. Estructura modelada con la sustitución A111T en el panel izquierdo. En la estructura obtenida del modelado se alarga en dos aminoácidos la lámina β -plegada. La diferencia en la ubicación espacial de las cadenas laterales de los aminoácidos de la posición 111 es evidente.

Posteriormente se analizó la posibilidad de que, por las obvias diferencias entre las cadenas laterales de la alanina y la treonina, el tamaño y densidad de carga de la cadena lateral pudiera interrumpir interacciones de carácter hidrofóbico. Para ello se observó cuáles aa poseen orientada su cadena lateral hacia el centro de la molécula (orientación en la que se encuentra el residuo de la sustitución A111T), en el dominio en que se encuentra la sustitución. Como resultado de dicho análisis se observó que los residuos que poseen sus cadenas laterales orientadas hacia el interior de la molécula (al igual que T111) son: L66, F67, W69, L81, V109, L121, V123, I148, P150, M154, A156, V181, V183, L187, A194, I197 y V199. Como era de esperarse, todos los aa poseen cadenas laterales hidrofóbicas, por lo tanto, la sustitución A111T podría (dado que la treonina es hidrofílica) estar desestabilizando el núcleo hidrofóbico de ese dominio de VP2. En el gráfico presentado en la Fig. 4.9.5, se puede observar la orientación de estos aa junto a la T111. Como se observa en la Fig. 4.9.4, la cadena lateral de T111 se encuentra localizada más profundamente en el núcleo hidrofóbico que la de A111, por lo no se analizaron las distancias de esta cadena lateral con respecto a otros aa de dicho núcleo hidrofóbico, ya que es obvio que las distancias habrán cambiado, no aportando información adicional.

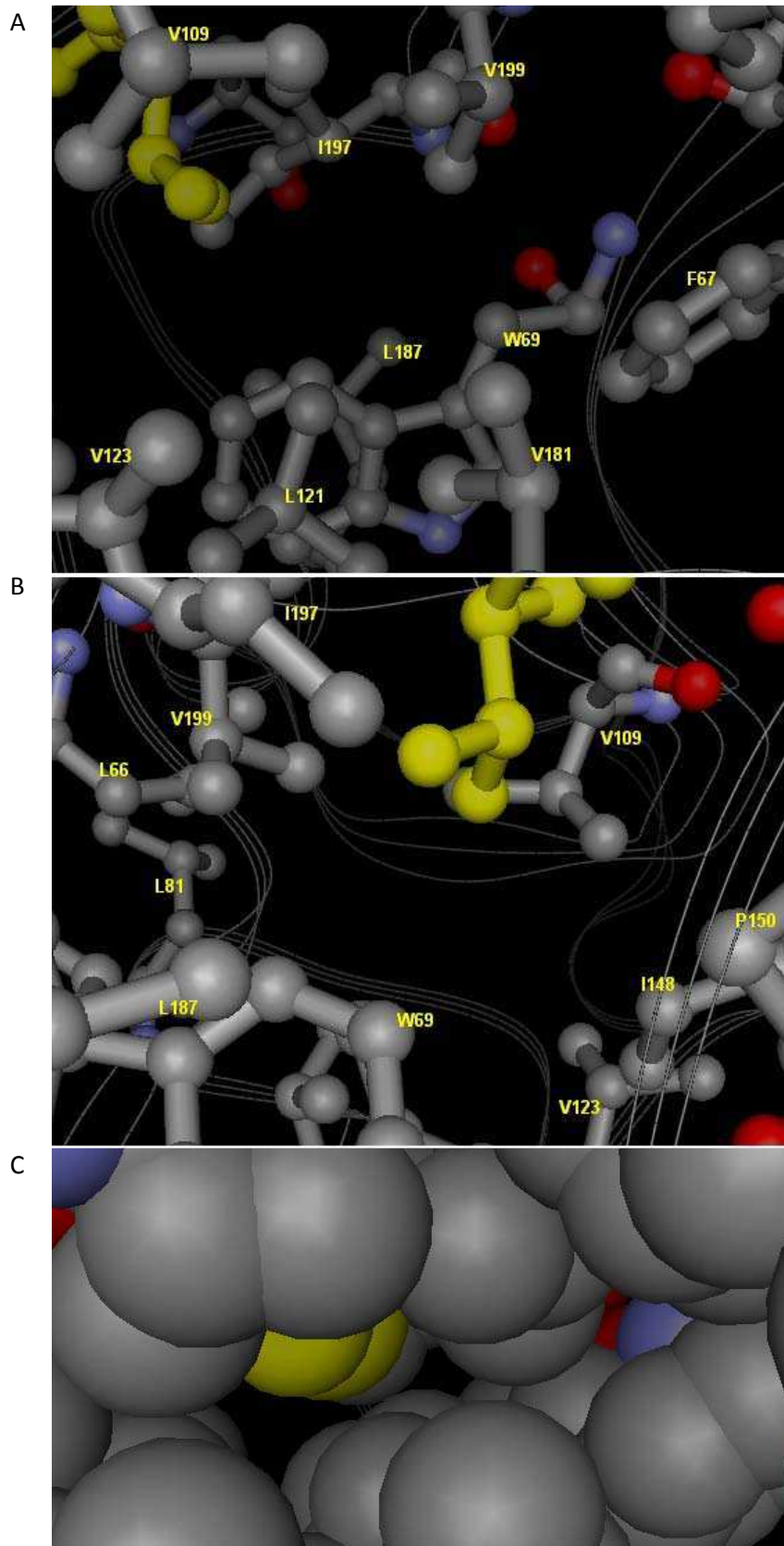


Figura 4.9.5. Entorno de la cadena lateral de la sustitución A111T. Se grafica en amarillo el aminoácido T111. Adicionalmente se grafican los aminoácidos que poseen sus cadenas laterales orientadas hacia el interior de la molécula. La triple línea marca el esqueleto de la cadena peptídica. El oxígeno se marca en color rojo, el nitrógeno en azul, y los carbonos en gris. **(A)** Del aminoácido T111 el átomo más cercano al observador es el oxígeno de su cadena lateral. **(B)** Del aminoácido T111 el átomo más cercano al observador es el carbono de su cadena lateral (grupo metilo). **(C)** Representación similar a **A**, mostrando el alcance de las nubes electrónicas, y evidenciando el entorno hidrofóbico que rodea a la cadena lateral de T111.

Por último, se obtuvieron los siguientes valores de analizar la estructura por el método computacional: QMEAN4: 0.717 y QMEAN *Z-score*: -1.03. Estos valores indican que, si bien el modelo es apropiado para la secuencia aminoacídica (QMEAN4), existe la posibilidad que dicha molécula presente problemas de estabilidad, ya que los parámetros termodinámicos estimados para la molécula modelada se alejan de los obtenidos de cristalografías de alta resolución (QMEAN *Z-score*).

Dadas las obvias alteraciones producidas por la sustitución en la estructura secundaria, y el bajo puntaje de QMEAN *Z-score* obtenido se decidió realizar la reversión de dicha mutación en el clon completo.

4.9.3 Sustituciones en 3D^{pol}.

En este caso el alineamiento de secuencias dio como resultado que la proteína 3D^{pol} de la cepa C-S8c1, publicada en Ferrer-Orta y cols. (2004 y 2007) es la más similar, con una identidad del 99.362 % (Nº de acceso en PDB: 2EC0).

Al observar la superposición de la molécula molde con la modelada se encontraron solo dos lugares donde hay pequeñas diferencias entre ambas estructuras. Ambas se encuentran en *loops* que conectan zonas con estructura secundaria de α -hélice o β -plegada (Fig. 4.9.6).

Del análisis con el software QMEAN se obtuvo un valor de QMEAN4 de 0.715 y de QMEAN *Z-score* de -0.79, indicando que la estructura obtenida del modelado posee un alto grado de ajuste a la secuencia y que los parámetros termodinámicos analizados están en concordancia con los observados en gran parte de las proteínas cristalizadas presentes en las bases de datos, dándole a la estructura obtenida una confiabilidad alta.

4.9.3.1 Sustitución L85P en 3D^{pol}.

Para poder discernir si la sustitución L85P modifica la estructura secundaria de la zona donde se ubica (o de zonas aledañas), se analizó la superposición de ambas proteínas en la zona en cuestión. En la Fig. 4.9.7 se muestra un acercamiento de la superposición de ambas estructuras en la cual no se observan diferencias significativas entre las mismas.

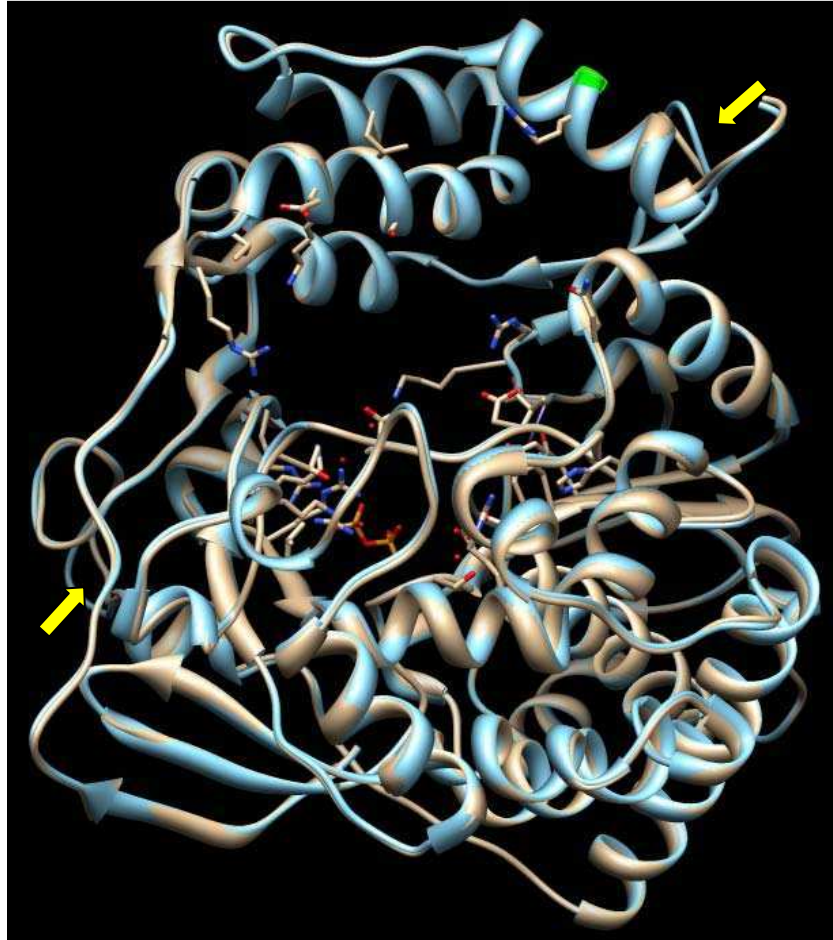


Figura 4.9.6. Modelado de 3D^{pol}. Superposición de la proteína 3D^{pol} modelada (celeste) y la estructura de la molécula cristalizada de 3D^{pol} de la cepa C-S8c1 (gris). Las flechas amarillas indican las zonas donde se observan diferencias entre ambas estructuras. La ubicación de la sustitución L460R se marca en verde.

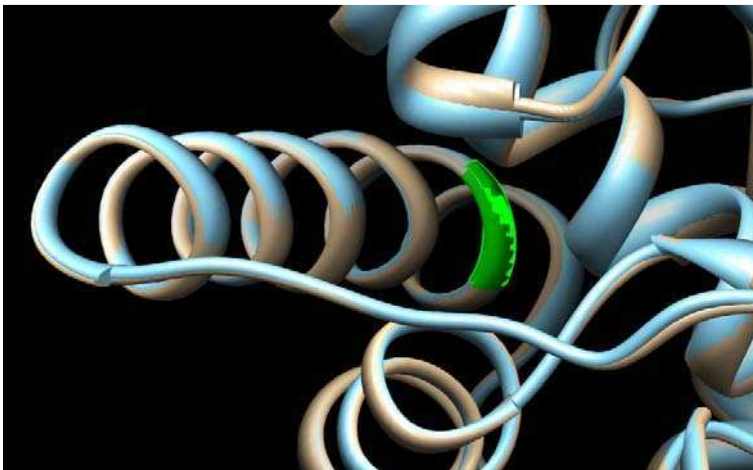


Figura 4.9.7. Detalle en la posición 85 de las estructuras superpuestas de la proteína 3D^{pol} de la cepa C-S8c1 y de la molécula en estudio. La posición 85 se marca en verde. No se aprecian diferencias entre ambas estructuras en la zona de la sustitución o en zonas aledañas.

Adicionalmente se observó que las cadenas laterales de los aa en la posición 85 se orientan de forma similar, más allá de su diferencia en tamaño (Fig. 4.9.8). Dado que ambos son aa hidrofóbicos, orientados de forma similar, y las estructuras de la proteína molde y la modelada no muestran ninguna diferencia al superponerlas, consideramos que esta

sustitución tiene una baja probabilidad de producir una alteración importante en el plegamiento y o estabilidad de la proteína 3D^{pol}.

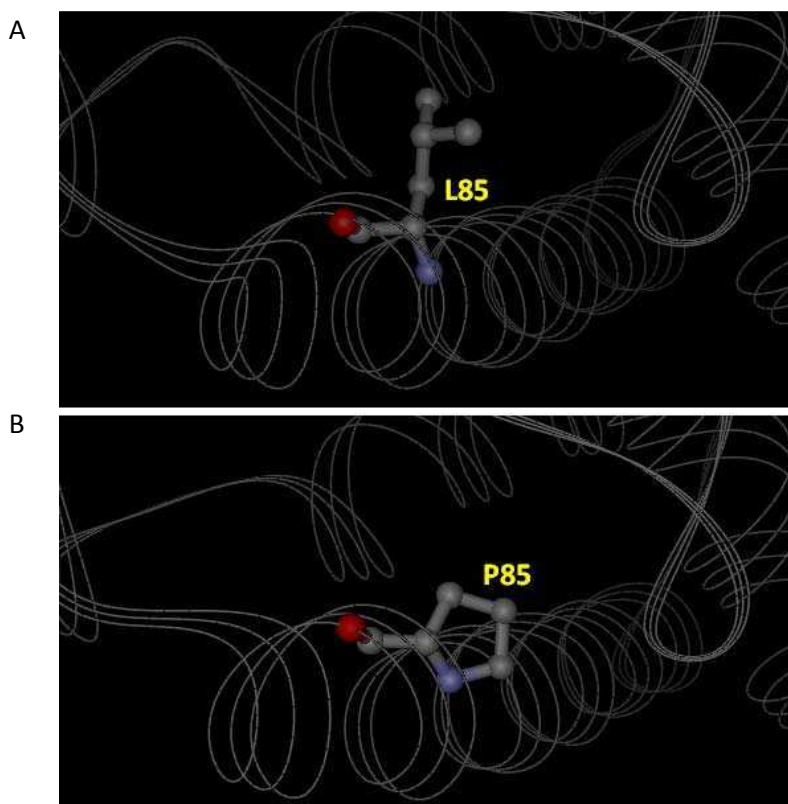


Figura 4.9.8. Orientación espacial de las cadenas laterales de L85 y P85. La triple línea marca el esqueleto de la cadena peptídica. El oxígeno se marca en color rojo, el nitrógeno en azul, y los carbonos en gris. **(A)** Orientación de la cadena lateral de L85 en 3D^{pol} de la cepa C-S8c1. **(B)** Orientación de la cadena lateral de P85 en la molécula de 3D^{pol} en estudio.

Por estas razones se decidió no darle prioridad a esta sustitución al momento de realizar las reversiones en el clon completo.

4.9.3.2. Sustitución L460R en 3D^{pol}.

En la Fig. 4.9.6, la sustitución L460R se encuentra marcada en verde, allí puede observarse que la estructura secundaria de la molécula en esa zona no se ve afectada. Al realizar un análisis más detallado de esa zona en particular se observó que la cadena lateral de la asparagina 460 se encuentra expuesta al solvente al igual que la L460 de la molécula molde (figura 4.9.9), esto (adicionalmente al hecho de que la estructura secundaria de α -hélice en el lugar de la sustitución se mantiene) indicaría que R460 no genera una modificación en el plegamiento de 3D.

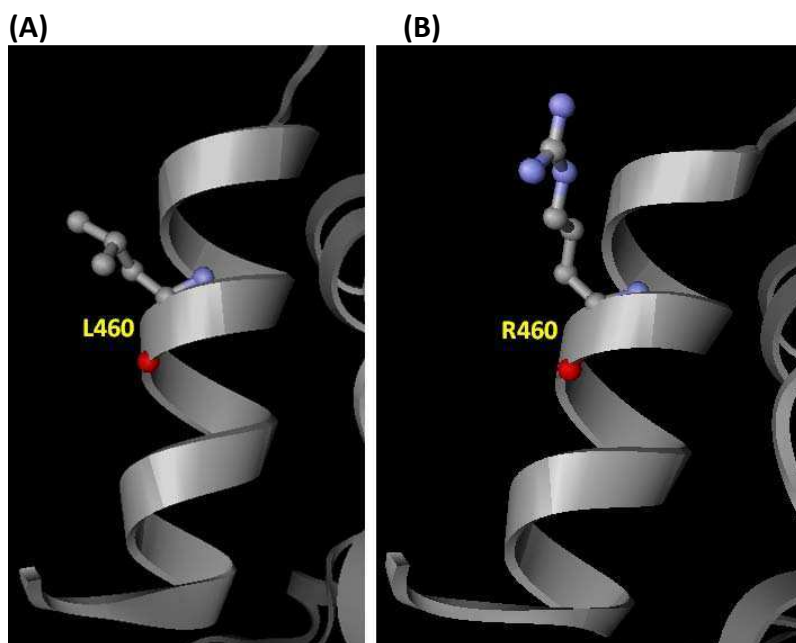


Figura 4.9.9. Orientación espacial de las cadenas laterales de L460 y R460. La cinta gris marca el esqueleto de la cadena peptídica. El oxígeno se marca en color rojo, el nitrógeno en azul, y los carbonos en gris. **(A)** Orientación de la cadena lateral de L460 en 3D^{pol} de la cepa C-S8c1. **(B)** Orientación de la cadena lateral de R460 en la molécula de 3D^{pol} en estudio. En ambos casos la cadena lateral se orienta hacia el exterior de la molécula, quedando expuesta al solvente.

Por otra parte en la publicación de Ferrer-Orta y cols. (2004) se reporta que en dos cristalizaciones diferentes hechas por ese grupo se observó una superficie de interacción entre moléculas vecinas de 3D^{pol} formada por los aa localizados en el extremo carboxilo-terminal (desde el residuo 451 hasta el final de la molécula), aunque los autores no descartan que dicha interacción pueda ser un artefacto producido por la formación de los cristales de la proteína.

Adicionalmente, diferentes autores han reportado interacciones proteína-proteína entre la polimerasa 3D^{pol} de integrantes de la familia *Picornaviridae*. Entre ellas se encuentran las interacciones entre 3AB-3D y 3B-3D en poliovirus (Strauss y cols., 2007), 3B-3D en VFA (Ferrer-Orta y cols., 2006) y 3D-3D en poliovirus (Hobson y cols., 2001).

Más precisamente, Hobson y cols. (2001) introdujeron mutaciones puntuales en el extremo carboxilo terminal de 3D (zona en la que se encuentra uno de los dominios de interacción 3D-3D reportados por este grupo) en un clon infeccioso de PV. El efecto producido por tres de estas mutaciones puntuales fue la ausencia absoluta de formación de placas de lisis, indicando la falta de viabilidad de estos mutantes. Curiosamente una de estas mutaciones se encuentra en la posición equivalente en PV al aa 460 en 3D de VFA, y otra de ellas en al aa 461 (conservado entre ambos virus). La ubicación de las mutaciones antes mencionadas, así como un alineamiento de la secuencia proteica de PV con VFA se presentan en la Fig. 4.9.10.



Figura 4.9.10. Alineamiento de los extremos carboxilo-terminal de las proteínas 3D de VFA y Poliovirus. En celeste se marcan los aminoácidos conservados. Los asteriscos debajo de la secuencia de PV indican las posiciones en las que se realizaron mutaciones puntuales en el trabajo de Hobson y cols. (2001). La flecha negra sobre la secuencia de VFA marca la posición 460.

Por lo expuesto anteriormente se decidió realizar la reversión de la mutación L460R en el clon pK-VFA/O1/Cam.

Dado que al momento de realizar este trabajo la proteína de VFA 2C no ha sido aun cristalizada, la sustitución C76F en dicha proteína no fue incluida en el análisis.

4.10. Reversión de las mutaciones encontradas en pK-VFA/O1/Cam.

A partir del resultado del análisis realizado se realizaron tres tipos de revertantes del clon pK-VFA/O1/Cam. Las mutaciones elegidas para realizar las reversiones fueron N46D en la proteasa L^{pro}, A111T en la proteína VP2 y L460R en la polimerasa 3D.

4.10.1. Reversión de la mutación N46D.

Para revertir de ácido aspártico (D) a asparagina (N) el aa en la posición 46 de la proteasa L^{pro} se realizó inicialmente una mutagénesis dirigida (Papworth y cols., 1996) con el clon pK-VFA/O1/Cam entero, utilizando el par de *primers* CorrL-F y CorrL-R diseñados para tal fin. Luego de varios intentos en los cuales esta estrategia demostró no ser efectiva se decidió modificarla. Un diagrama de esta estrategia se ejemplifica en la Fig. 4.10.1. Dado que no existen sitios de corte únicos para ERs en el genoma de VFA que se ubiquen río arriba de la mutación se realizó mutagénesis dirigida sobre el plásmido pG-L1 que contiene solo el segmento genómico L1 (una alícuota de la restricción de pG-L1 puede verse en la Fig. 4.10.2.A). Los ADNs con la reversión deseada se identificaron por secuenciación. El segmento que comprende la mutación se subclonó con las ERs AflII y XbaI en la construcción pB-SL1-pC, y finalmente se suplantó la mitad 5' del clon pK-VFA/O1/Cam con el este segmento con la reversión buscada, utilizando los sitios SpeI y NotI.

Al igual que en los casos anteriores se los purificó, ligó y transformó para obtener el clon pK-VFA/O1/Cam-LpN46. Cabe aclarar que por la diferencia mínima entre los tamaños del

esqueleto del plásmido pBluescript SKII y el segmento SL1pC (3000 y 3046 pb, respectivamente), estos no pudieron ser separados por electroforesis y por lo tanto el producto de la ligación habrá incorporado en algunos casos el segmento SL1pC y en otros el esqueleto del plásmido. Por esa razón, las colonias resistentes a kanamicina se volvieron a plaquear por duplicado en placas de Petri con medio selectivo para kanamicina o ampicilina, descartando las colonias que incorporaron el esqueleto del plásmido (amp^r) y seleccionando las colonias que solo Kan^r . Para confirmar el patrón de restricción (y los tamaños de los fragmentos) se digirió con la ER XbaI (Fig. 4.10.2B). Los revertantes se confirmaron por secuenciación.

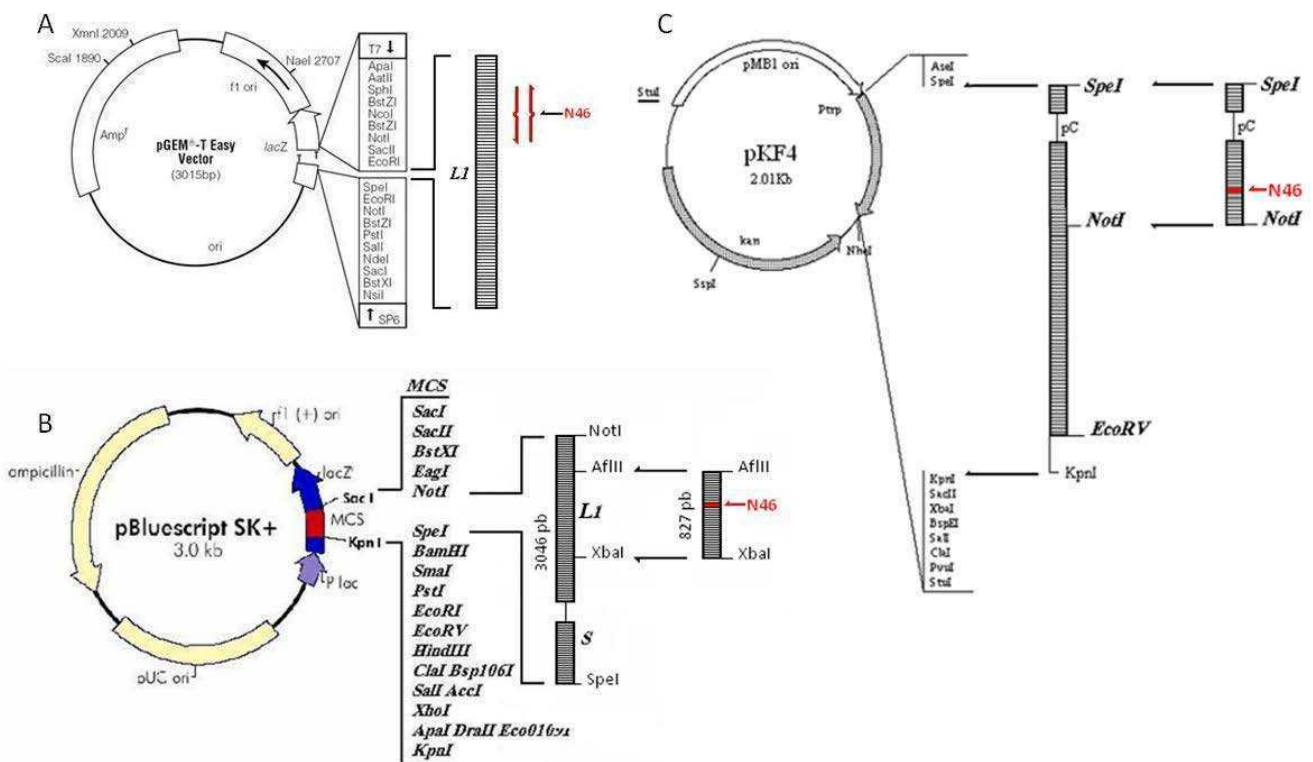


Figura 4.10.1. Esquema del método utilizado para revertir la mutación N46D. (A) Mutagénesis dirigida sobre la construcción pG-L1. **(B)** Subclonado del fragmento AfIII-XbaI conteniendo la reversión en pB-SL1-pC. **(C)** Subclonado del segmento SL1-pC conteniendo la reversión en el clon *full length*.

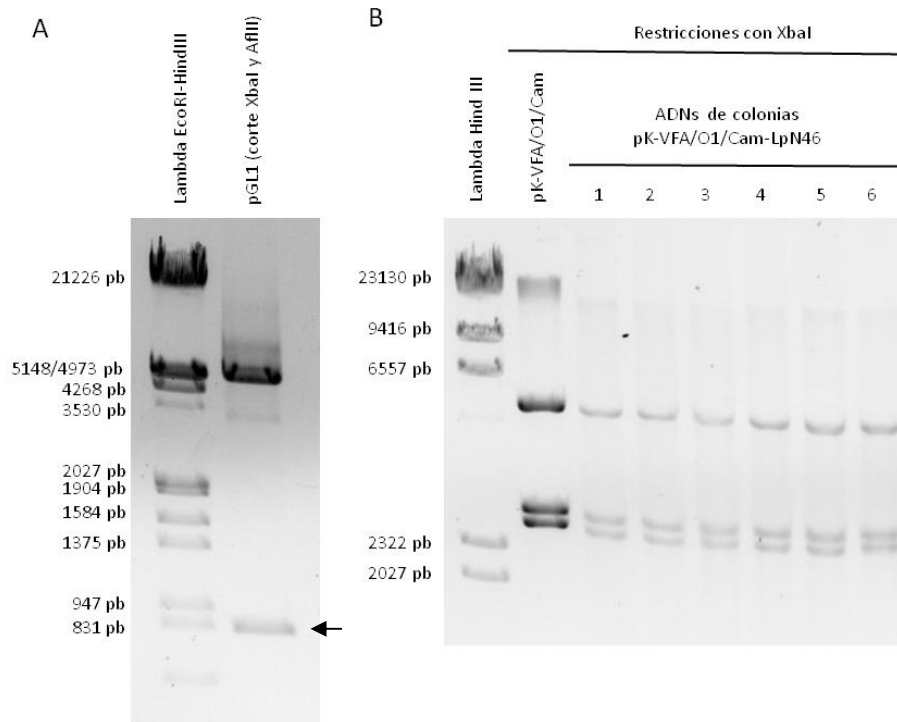


Figura 4.10.2. Restricción de pGL1-N46D y screening de pK-VFA/O1/Cam-LpN46 (A) Electroforesis del plásmido pG-L1 que contiene la reversión de la mutación N46D cortado con las ERs AflIII y XbaI. El fragmento XbaI-AflIII (827 pb) se indica con la flecha. **(B)** Digestiones con XbaI de los clones obtenidos de pK-VFA/O1/Cam-LpN46. Se mantiene el patrón de restricción del clon original.

4.10.2 Transfección de células BHK-21 con ARN transcripto de pK-VFA/O1/Cam-LpN46.

El ADN de pK-VFA/O1/Cam-LpN46 se linealizó con la ER EcoRV, se purificó y se realizó una transcripción *in vitro* utilizando 1µg de DNA como templado con el kit de transcripción *in vitro* MAXIscript (Ambion). Posteriormente se purificó el ARN con el kit *SV total RNA isolation system* (Promega), se verificó el tamaño del ARN generado en una electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes y se cuantificó por absorbancia con el equipo *Nanodrop*.

Las transfecciones se realizaron utilizando DMRIE-C (Invitrogen) como agente transfectante. A las 48 hpt no se observó ECP, por lo que se realizaron dos pasajes en células con el lisado clarificado, sin observarse ECP dentro de la 48 hs.

4.10.3 Reversión de la mutación A111T.

Para construir un segmento con la reversión de treonina a alanina en la posición 111 de la proteína VP2 se utilizó la técnica de *overlap extension PCR* (OE-PCR) (Higuchi y cols., 1988; Liang y cols., 1995; y Urban y cols., 1997) y luego se reemplazó dicho fragmento en el

clon pK-VFA/O1/Cam (Fig. 4.10.3). Para ello se realizaron dos reacciones de PCR por separado con los pares de *primers* AfIII-For – CorrVP2-R y CorrVP2-F - L2r para generar dos amplicones de 823 pb y 3221 pb, respectivamente, que se solapan en uno de sus extremos. Una vez obtenidos estos amplicones se los purificó de un gel de agarosa y se los utilizó para generar el fragmento de 4014 pb que posee la reversión deseada. Cabe aclarar que para la OE-PCR no se utilizan *primers*, ya que no se amplifica un segmento determinado sino que se fusionan los fragmentos previamente amplificados que se solapan en uno de sus extremos. En la Fig. 4.10.4 se presentan las electroforesis realizadas con alícuotas de cada una de estas PCRs. En la electroforesis de la Fig. 4.10.4C se marca con un asterisco el remanente de los amplicones originales utilizados para la fusión. Posteriormente se reemplazó el segmento comprendido entre los sitios de corte de las ERs AfIII y EcoRI en el clon pK-VFA/O1/Cam (Fig. 4.10.3B) y, luego de verificar el patrón de restricción con la ER XbaI (Fig.4.10.5) se secuenciaron los ADNs obtenidos para identificar los revertantes. Al clon con esta reversión se lo denominó pK-VFA/O1/Cam-VP2A111.

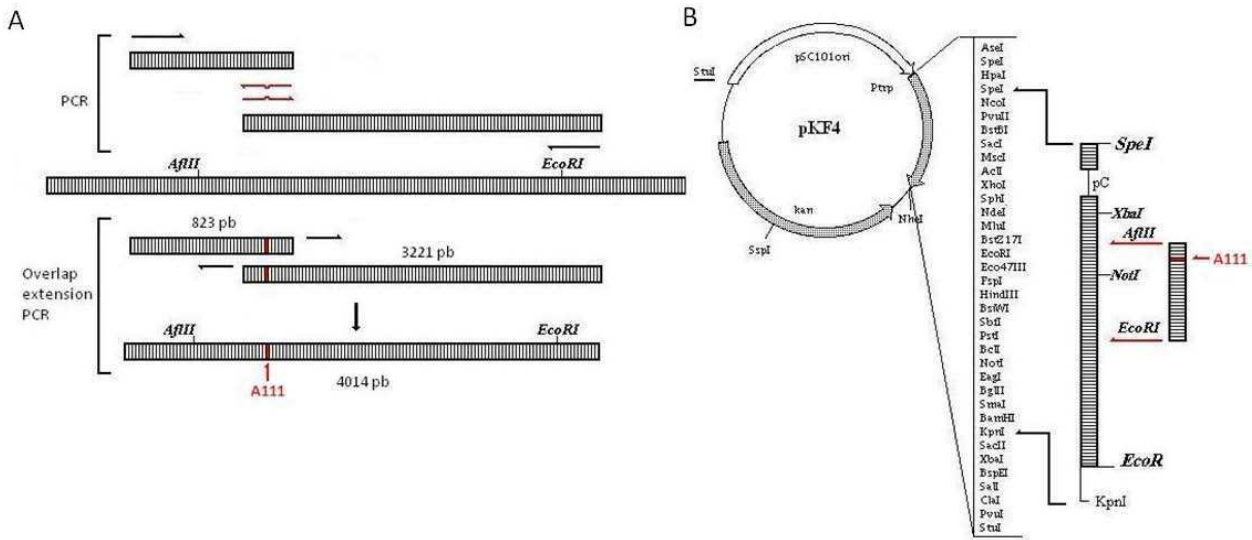


Figura 4.10.3. Esquemas de OE-PCR y clonado. (A) Diagrama de las PCRs realizadas para obtener dos fragmentos que poseen la reversión de A111T en uno de sus extremos (parte superior). Solapamiento de los amplicones y fusión de los mismos. (B) Subclonado del fragmento AflIII-EcoRI conteniendo la reversión en el clon full length.

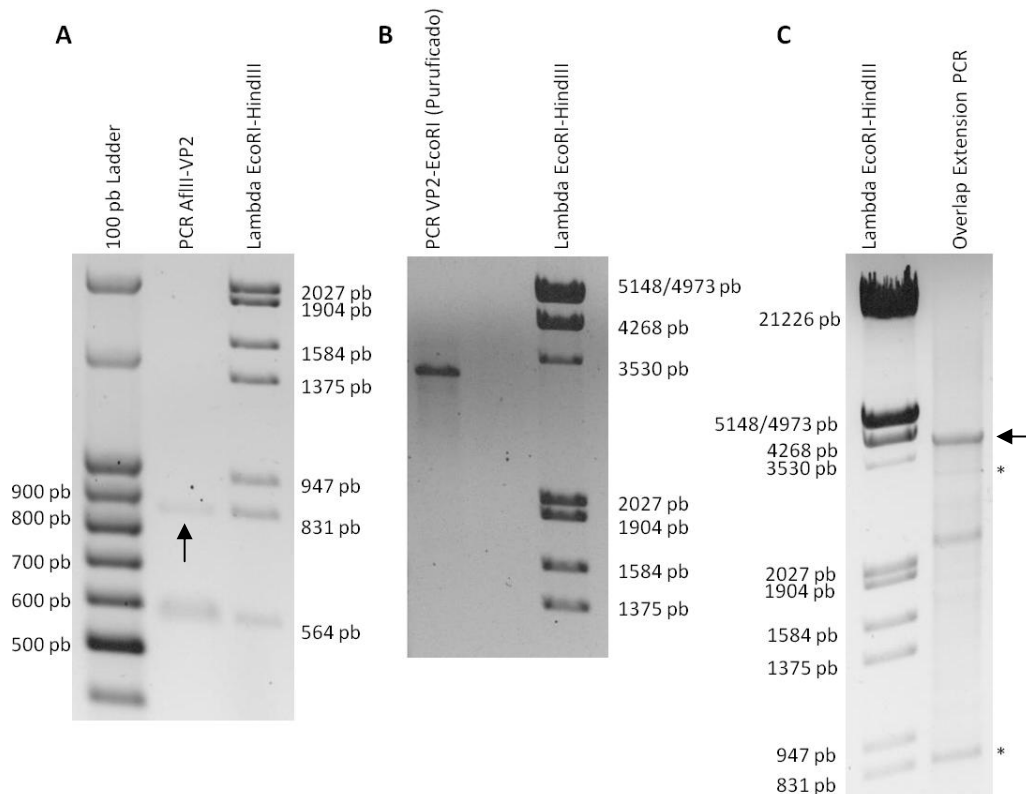


Figura 4.10.4. OE-PCR. (A) Productos de la PCR en la cual se obtuvo el amplicón AflIII-VP2 de 823 pb (marcado con una flecha vertical). (B) Electroforesis del amplicón VP2-EcoRI (3221 pb) purificado. (C) OE-PCR realizada con los amplicones AflIII-VP2 y VP2-EcoRI para fusionarlos en el nuevo amplicón de 4012 pb. Se marca con un asterisco el remanente de los amplicones originales utilizados para la fusión y con una flecha el producto final.

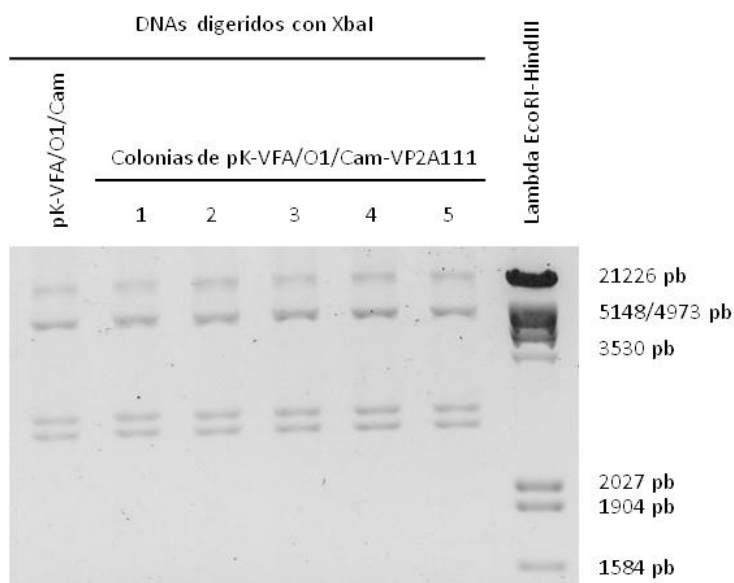


Figura 4.10.5. Screening de de pK-VFA/O1/Cam-VP2A111.

Verificación del patrón de restricción con la ER XbaI de los ADNs obtenidos en la construcción de pK-VFA/O1/Cam-VP2A111.

4.10.4 Transfección de células BHK-21 con ARN transcripto de pK-VFA/O1/Cam-VP2A111.

Los ARNs transcriptos de pK-VFA/O1/Cam-VP2A111 se obtuvieron como en 4.10.2, y una vez cuantificados se transfectaron en células utilizando DMRIE-C.

Como en el caso anterior, no se observó ECP ni a las 48 hpt, ni a las 48 hs de los dos primeros pasajes en células.

4.10.5. Reversión de la mutación L460R.

Para la reversión de arginina a leucina en la posición 460 de la polimerasa 3D se utilizó una estrategia similar a la utilizada en el caso de la mutación L46D. Un diagrama de dicha estrategia se presenta en la Fig. 4.10.6. En este caso se realizó una mutagénesis dirigida con los *primers* Corr3D-F y Corr3D-R en el segmento L3 (utilizando la construcción pSFI-L3), y posteriormente se identificaron los clones revertantes por secuenciación. Un dato interesante en este caso fue que adicionalmente a los clones revertantes buscados se encontraron clones en los cuales se produjo la duplicación parcial de la secuencia comprendida en los *primers* utilizados, y se encontraron clones donde las repeticiones llegaron a estar presentes hasta diez veces. En la Fig. 4.10.7 se presenta un alineamiento donde puede observarse una duplicación de dicha secuencia, y en el panel B, se postula un posible mecanismo por el cual podría producirse.

parte inferior de la banda correspondiente a L3. En la Fig. 4.10.8C se presenta una electroforesis con los fragmentos purificados previos a la ligación, donde puede observarse que en la purificación del ADN de L3-L460 no pudo eliminarse totalmente del esqueleto de pSFI. Finalmente se ligaron el fragmento L3-L460 y el esqueleto del clon pK-VFA/O1/Cam (cuyo segmento L3 fue removido), y se transformaron bacterias competentes. Como en los casos anteriores se realizó un *screening* de las colonias obtenidas verificando el patrón de restricción con la ER XbaI, y se identificaron los clones revertantes por medio su secuenciación. Los clones revertantes fueron denominados pK-VFA/O1/Cam-3DL460.

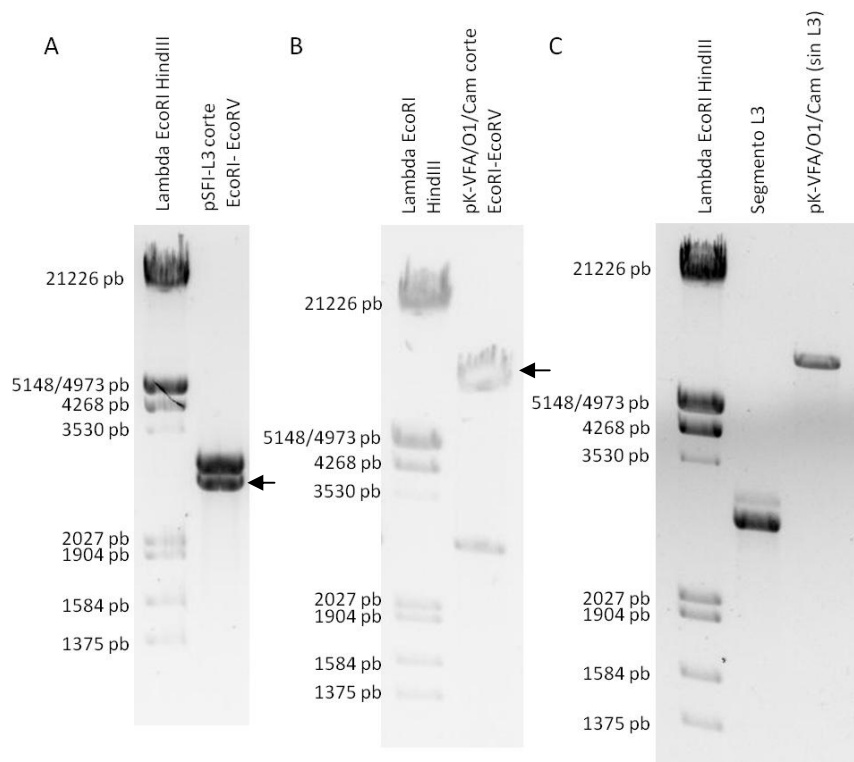


Figura 4.10.8. Restricciones de pSFI-L3-L460 y pK-VFA/O1/Cam. (A) Corte de la construcción pSFI-L3-L460 con las ERs EcoRI y EcoRV. Se marca con una flecha el segmento L3-L460. **(B)** Digestión del clon pK-VFA/O1/Cam con las mismas encimas que el caso anterior. El esqueleto del clon se indica con una flecha. **(C)** Fragmentos purificados de L3-L460 y el clon (sin el fragmento L3) de las digestiones realizadas anteriormente.

4.10.6 Transfección de células BHK-21 con ARN transcritos de pK-VFA/O1/Cam-3DL460.

Los ARNs transcritos de pK-VFA/O1/Cam-3DL460 se obtuvieron como en 4.10.2, y una vez cuantificados se transfectaron en células utilizando DMRIE-C. No se detectó ECP en las observaciones realizadas a las 24 y 48 hpt. De igual manera que en los casos anteriores, se realizaron dos pasajes en células en los cuales tampoco se observó ECP a las 24 o 48hs.

4.11 PARTE II.

Construcción de un replicón a partir de la copia del genoma completo de la cepa del VFA O1/Campos, sustituyendo las proteínas de la cápside por el gen reportero Luciferasa.

Dado que el trabajo con VFA infeccioso solo puede realizarse en laboratorios de bioseguridad de nivel 3 Agricultura (NBS3A o 4 OIE), se construyó un replicón derivado del clon *full length* como herramienta para estudios de replicación viral. Dicho replicón, al ser incapaz de generar viriones, permitirá su utilización fuera de laboratorios de alta seguridad.

Para la construcción del replicón se eliminó la mayor parte de la región codificante de las proteínas estructurales (P1) utilizando sitios de corte existentes en la secuencia de O1/Campos, a fin de no tener que realizar reamplificaciones para generar sitios adecuados de ERs, que conllevan el riesgo de introducir nuevas mutaciones. La estrategia usada deja intacta la secuencia de L^{pro} e inserta el gen reportero reemplazando solo parte de las proteínas estructurales. Para ello se utilizaron los sitios de corte para las ERs NsiI y XmaI (el sitio para XmaI es el mismo utilizado por McInerney y cols., 2000) para insertar la secuencia codificante de Luciferasa (Luc), en el mismo marco de lectura que la poliproteína, quedando fusionada a VP2 en su extremo amino-terminal y a VP1 en su extremo carboxi-terminal. Dado que la ER NsiI posee sitios de corte en el plásmido pKF4 (en donde se encuentra el clon *full length*) se trabajó con un segmento acotado del mismo (comprendido entre los sitios de corte para las ERs XbaI y XmaI) en el plásmido pBluescript SKII. Posteriormente al clonado del gen de Luciferasa se insertó nuevamente en el plásmido original utilizando los sitios AflII y XmaI. En la Fig. 4.11.1 puede verse un resumen de esta estrategia.

4.11.1 Clonado del fragmento genómico comprendido entre los sitios XbaI y XmaI en pBluescript.

Se subclonó el segmento genómico comprendido entre los sitios de corte de las ERs XbaI y XmaI (3084 pb) en el plásmido pBluescript SKII (3000 pb). La identificación de los ADN recombinantes se realizó mediante digestión con las ERs AflII y XmaI (se libera un fragmento de 2257 pb). En la Fig. 4.11.2 se presentan las fotos de las electroforesis de los ADN previos a la ligación y del *screening* con las ERs antes mencionadas. Los ADN que incorporaron el fragmento de VFA fueron denominados pBlue-InsVFA.

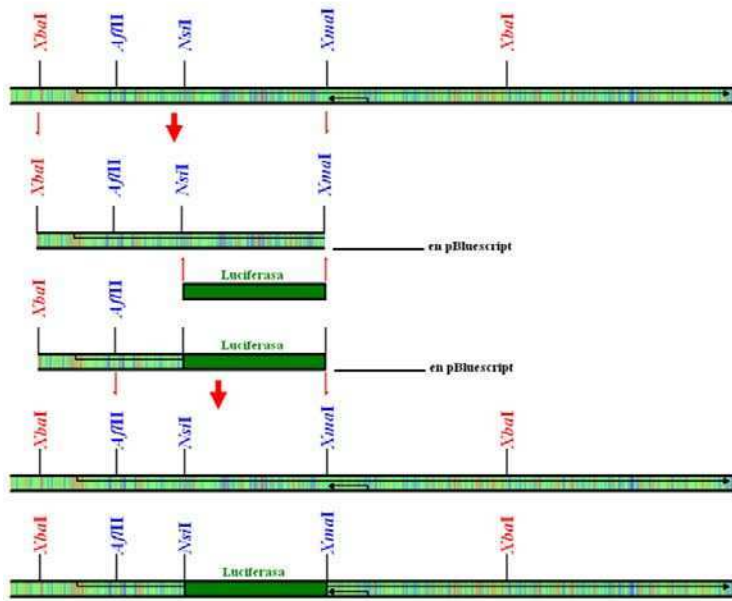


Figura 4.11.1. Esquema de la construcción del replicón. Inicialmente se subclona en pBluescript SKII el segmento genómico que se encuentra entre los sitios de corte para las ERs XbaI y XmaI. A dicho segmento se le incorpora la secuencia del gen Luc utilizando las ERs NsiI y XbaI. Por último se reemplaza en el clon completo el segmento que posee el gen Luc con las ERs AflIII y XmaI.

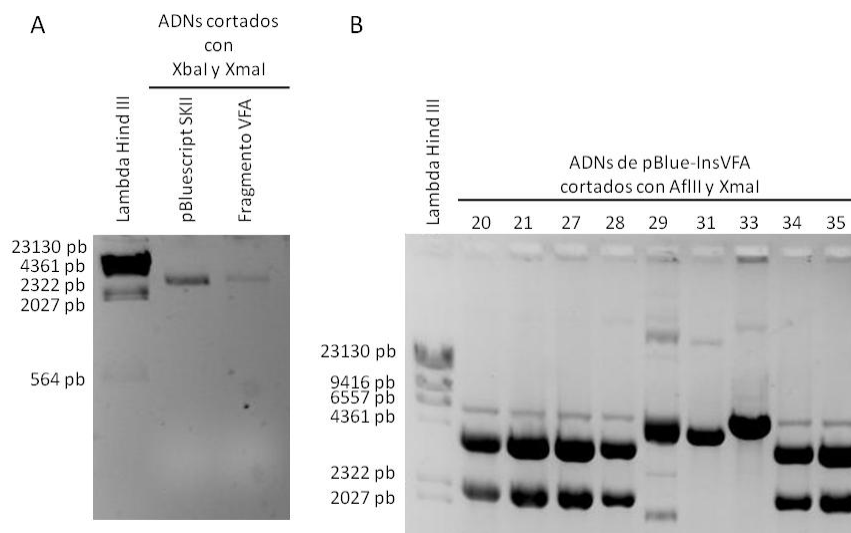


Figura 4.11.2 Clonado del segmento XbaI-XmaI en pBluescript SKII (A) Fragmentos purificados de las restricciones con XbaI y XmaI de pBluescript SKII y del segmento con la secuencia genómica de VFA. **(B)** Screening por restricción de los ADNs obtenidos durante la construcción de pBlue-InsVFA con AflIII y XmaI. Las colonias 20, 21, 27, 28, 34 y 35 incorporaron el inserto.

4.11.2 Amplificación por PCR de la secuencia codificante de la Luciferasa y clonado de la misma en pBlue-InsVFA.

Para la amplificación de la secuencia codificante de Luc se utilizó como templado de la reacción de PCR un plásmido que la contiene (cedido por la Dra. Andrea Gamarnik) y el par de primers NsiI-Luc-For/XmaI-Luc-Rev. La reacción se llevó a cabo utilizando la enzima GoTaq

(Invitrogen) y el amplicón fue clonado en el plásmido pGEMT-Easy (Promega). La identidad fue confirmada por medio de secuenciación.

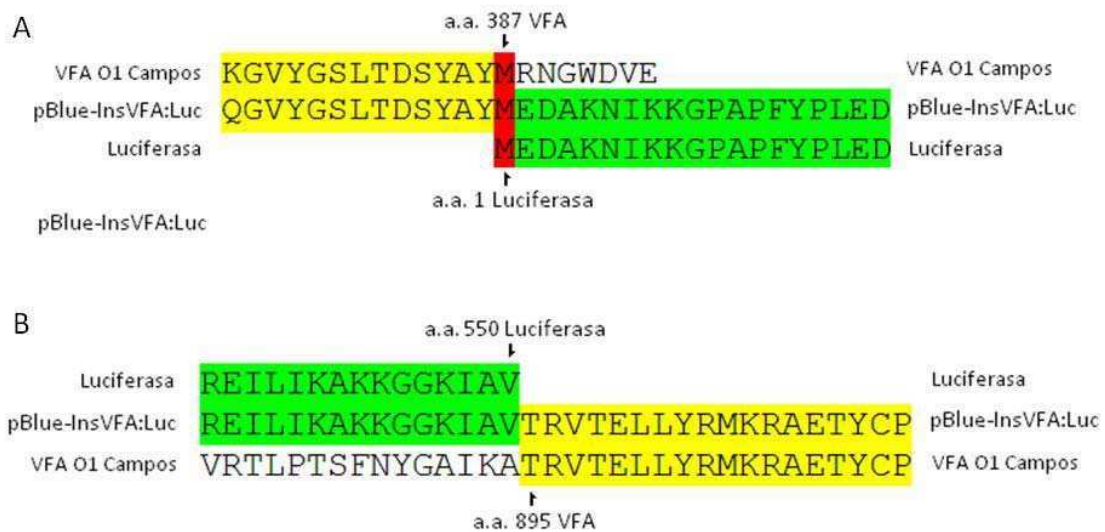
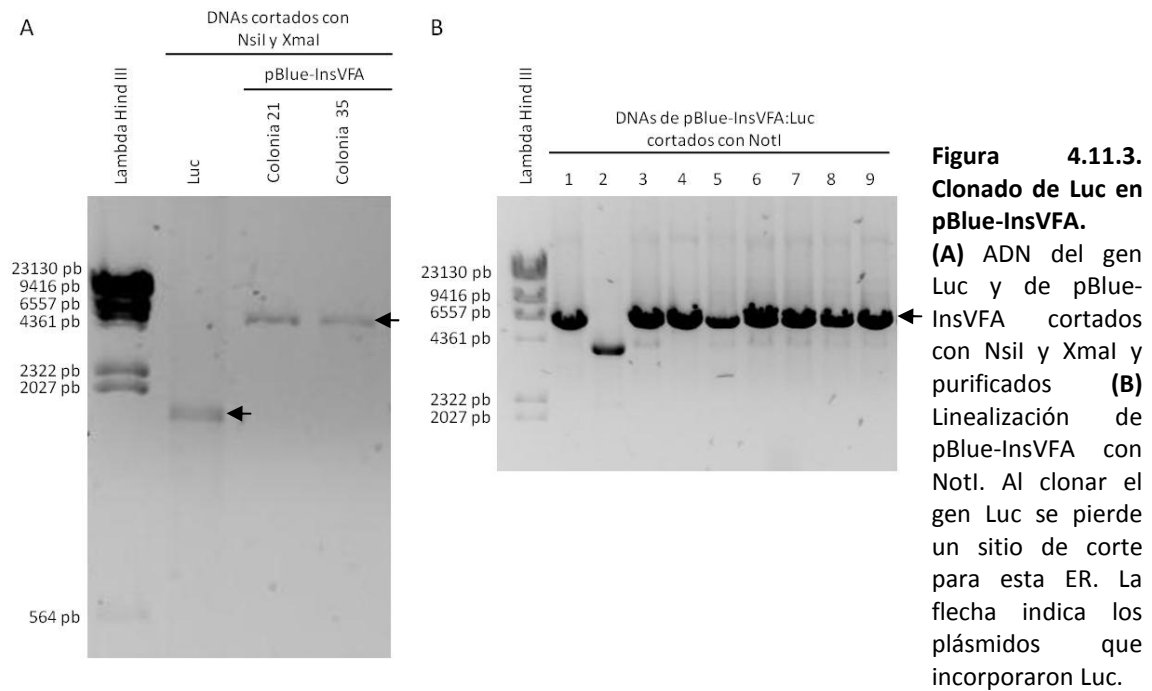


Figura 4.11.4. Alineamientos de las secuencias aminoacídicas de VFA O1/Campos, pBlue-InsVFA:Luc y Luc. (A) La secuencia de la poliproteína de VFA empalma en el aa 387 con el extremo carboxilo terminal de Luc. **(B)** El extremo carboxilo terminal de Luc (aa 550) empalma el aa 895 de la secuencia de la poliproteína viral.

Los plásmidos pGEM-Luc y pBlue-InsVFA se cortaron con las ERs NsiI y XmaI y se purificaron los fragmentos de interés. Una vez obtenidos los fragmentos (Fig. 4.11.3A) se ligaron y se transformaron de bacterias competentes. Las colonias recombinantes (pBlue-InsVFA:Luc) fueron identificadas por linealización con la ER NotI, (6084 pb), mientras que las

que no hayan incorporado Luc liberan un fragmento de 2325 pb (Fig. 4.11.3B). Se verificó el mantenimiento del marco de lectura por secuenciación. En la Fig. 4.11.4 se muestra el alineamiento de las zonas de unión de pBlue-InsVFA:Luc con las secuencias de VFA O1/Campos y de Luc.

Por último se clonó el segmento AfIII-XmaI de pBlue-InsVFA:Luc en el clon *full length* generando así el replicón pK-VFA:Luc. En la Fig. 4.11.5A se presentan las fotos de las electroforesis con los ADNs previos a la ligación. La identificación de los ADNs recombinantes se realizó por dos *colony PCR* simultáneas con los pares de *primers* NsiI-Luc-For / L2rev y XmaI-Luc-Rev / L1for (Fig. 4.11.5B), y se verificó la identidad de los insertos por secuenciación.

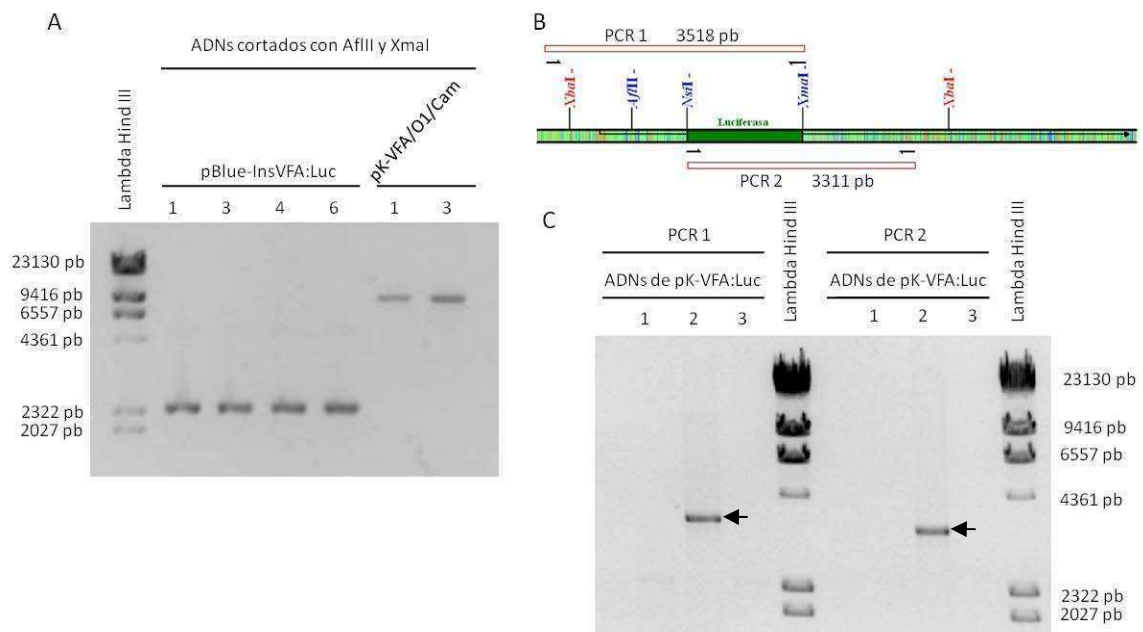


Figura 4.11.5. Clonado del fragmento AfIII-XmaI de pBlue-InsVFA:Luc en el esqueleto de pK-VFA/O1/Cam y screening. (A) ADNs cortados con AfIII y XmaI, y purificados, de pBlue-InsVFA:Luc y pK-VFA/O1/Cam. (B) Diagrama de las PCRs utilizadas para el screening de pK-VFA:Luc. (C) Electroforesis de los productos de PCR del screening para 3 ADNs obtenidos. Solo el ADN 2 ha incorporado el inserto que posee el gen Luc (flecha).

4.11.3. Transfección del replicón pK-VFA:Luc y evaluación de su capacidad replicativa por RT-PCR.

Para obtener una cantidad, y pureza adecuada del ADN de pK-VFA:Luc se realizó una preparación de ADN con el kit comercial de MAXIPrep (QUIAGEN), partiendo de un cultivo de *E.coli* de 500ml. Posteriormente se linealizó el ADN, se realizó una transcripción *in vitro* con el kit MEGAscript (Ambion) y se purificó el ARN resultante utilizando el kit SV Total RNA Isolation

System (Promega). En la Fig. 4.11.6 se muestra una electroforesis en condiciones desnaturizantes en la que se verifica la integridad del ARN transcripto.

Las transfecciones se realizaron con DMRIE-C (Invitrogen) en placas de 12 pocillos sobre células al 90% de confluencia. Luego se realizaron extracciones de ARN transcripto de pK-VFA:Luc y del control negativo (células incubadas solo con DMRIE-C sin ARN) a las 16 hpt y a las 26 hpt. Se extrajo el ARN con TRIZOL® y se trataron las muestras con DNAsa libre de ARNasas (Invitrogen) durante 30 min.

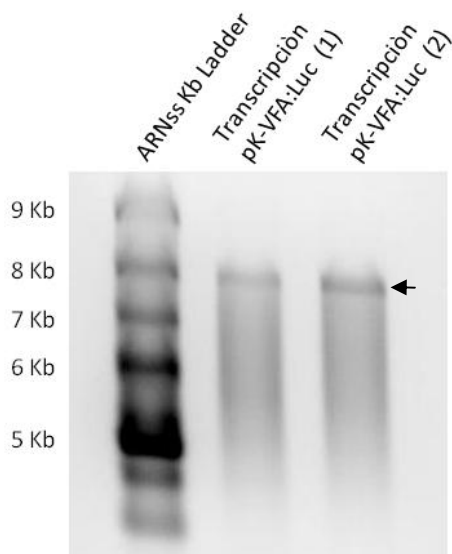


Figura 4.11.6. Transcripción *in vitro* del replicón pK-VFA:Luc. Electroforesis en condiciones desnaturizantes de los productos de dos reacciones independientes de transcripción *in vitro* de pK-VFA:Luc. La flecha indica la presencia del ARN del tamaño esperado.

La RT-PCR del ARN extraído se realizó en dos pasos. Para la RT se utilizó un *primer* específico (F5200) con una secuencia correspondiente a la hebra codificante para poder detectar la hebra negativa, que solo se produce durante el evento replicativo. Para la PCR se eligió un par de *primers* (3AG-F / 3AG-R) que amplifican una secuencia de 491 pb que incluyen un sitio de corte único en todo el genoma para la ER EcoRI, ubicado a 89 pb de uno de los extremos del amplicón (Fig. 4.11.7A). De esta manera solo se observará la digestión del producto en el caso que la amplificación haya sido específica, y al llevar a cabo la RT-PCR en dos pasos se utiliza como templado la hebra negativa únicamente. Adicionalmente, se incluyó un control de ARN sin ser sometido a la RT, para verificar que la amplificación no corresponda a ADN remanente de la transfección. Se observó un amplicón del tamaño adecuado, en las transfección con ARNs de pK-VFA:Luc (la identidad se confirmó mediante la restricción con EcoRI). No hubo amplificación en las muestras no sometidas a la RT (Fig. 4.11.7 B y C).

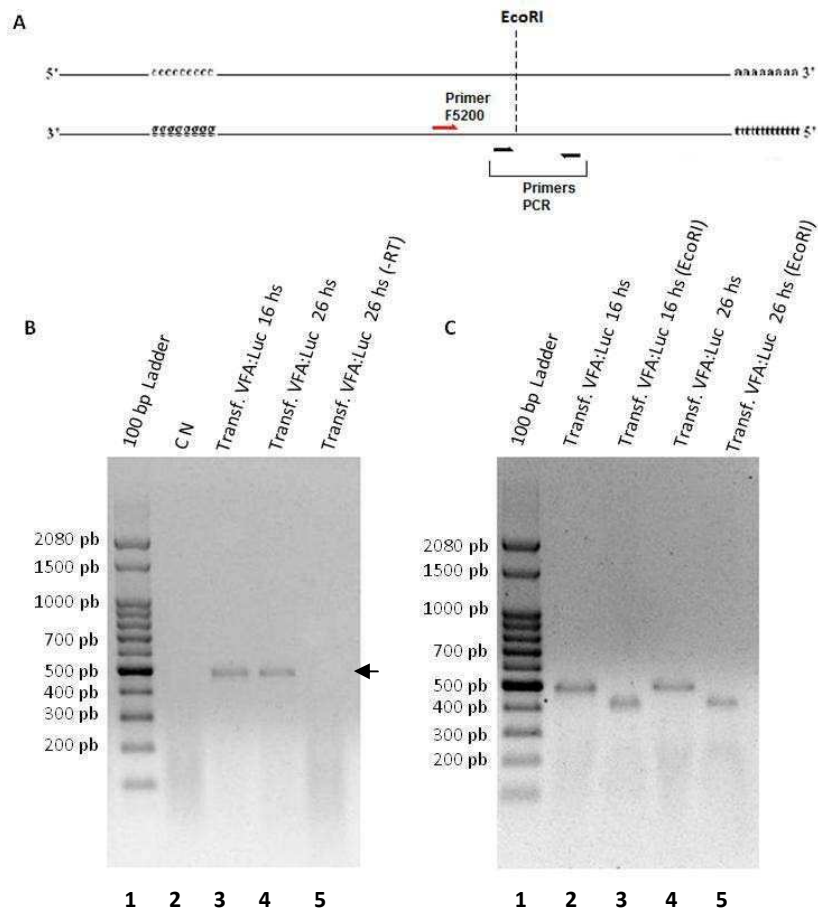


Figura 4.11.7. RT-PCR de la hebra negativa de VFA:Luc. (A) Diagrama de la localización y sentido de los *primers* utilizados en la RT-PCR en dos pasos realizada para la detección de la hebra negativa de VFA. (B) Electroforesis con los productos de las RT-PCR. Control negativo (calle 2), células transfectadas con VFA:Luc a las 16 hpt y 26 hpt (calle 3 y 4, respectivamente), células transfectadas con VFA:Luc 26 hpt sin realizar el paso de RT (calle 5). (C) Restricción con *EcoRI* de los amplicones obtenidos a las 16 hs (calles 2-3) y a las 26 hs (calles 4-5).

4.11.4. Verificación de la síntesis de proteínas del replicón pK-VFA:Luc por medio de inmunofluorescencia indirecta.

Células adheridas sobre cubreobjetos de vidrio se transfectaron de la manera expuesta anteriormente. Al cabo de 24 hs se fijaron las células con una solución de paraformaldehído al 4% en *buffer* PBS. Para la inmunofluorescencia se utilizaron dos anticuerpos primarios distintos: un anticuerpo monoclonal (IgG) que reconoce a la proteína no estructural 3A preparado en ratón (Seki y cols., 2009), y con un antisuero policlonal de ratón dirigido a la proteína no estructural 3Cpro. En ambos casos, el anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo monoclonal anti IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexafluor® 594, Life Colors de Invitrogen. La tinción de los núcleos se realizó con el colorante DAPI. Una vez obtenidos los preparados se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon (Fig. 4.11.8).

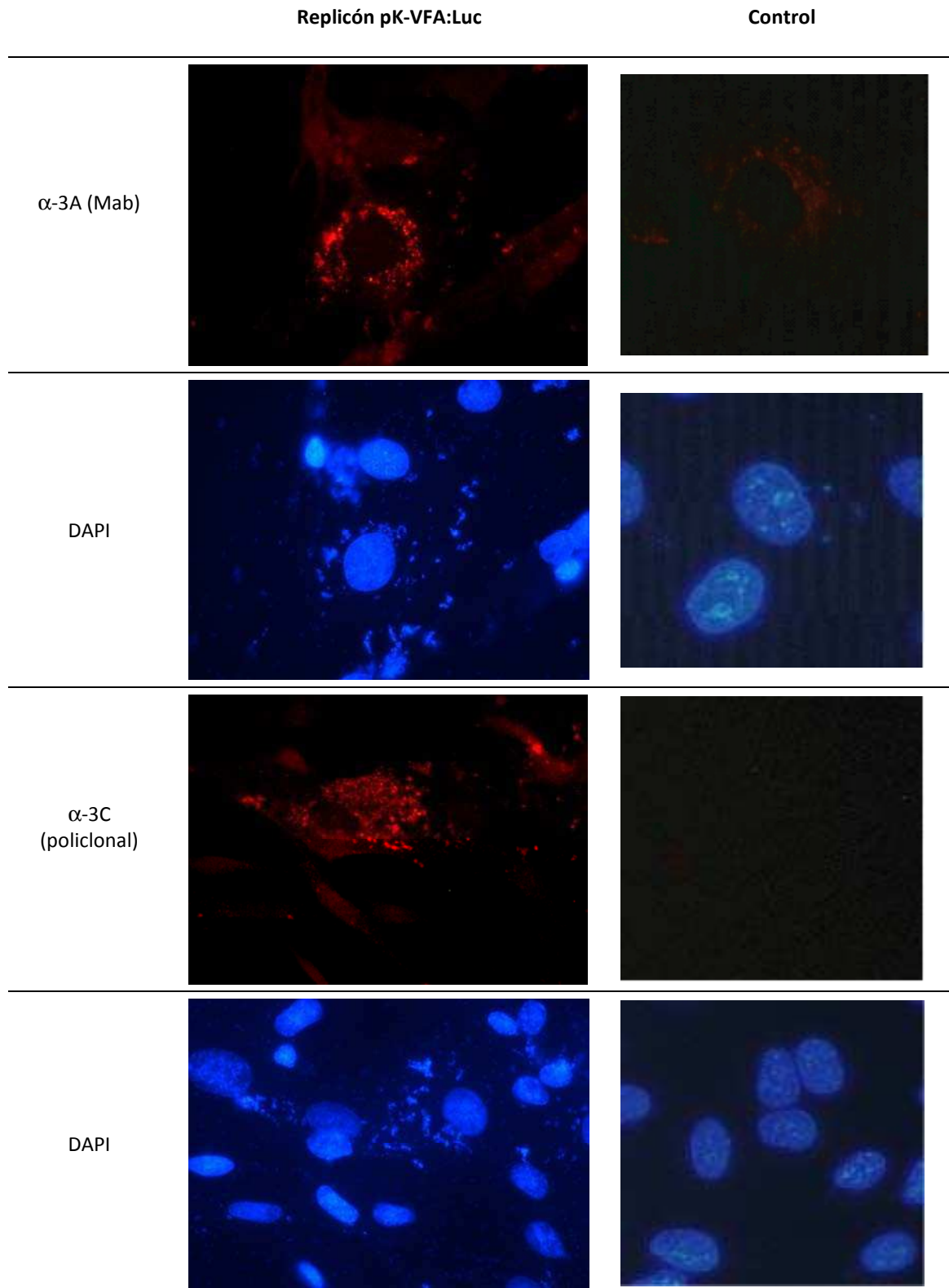


Figura 4.11.8. Detección del replicón pK-VFA:Luc por Inmunofluorescencia. Inmunofluorescencia indirecta de células BHK-21 transfectadas con ARNs transcritos del replicón pK-VFA:Luc y controles sin transfectar. Las primeras dos filas corresponden a las inmunofluorescencias hechas con un anticuerpo monoclonal anti 3A y su tinción con DAPI. Las filas 3 y 4 a las inmunofluorescencias realizadas con un antisuero policlonal anti 3Cpro y la tinción con DAPI de dichas células. En ambos casos el anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo monoclonal de conejo anti IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa 594

4.11.5. Evaluación de la actividad del gen reportero Luc.

Habiendo confirmado la capacidad replicativa y la síntesis de proteínas por parte del replicón pK-VFA:Luc, se evaluó la actividad de luciferasa como gen reportero utilizando el kit *Luciferase assay system* (Promega). Una vez cumplidas las 24 hpt se lisaron las células y se realizaron las mediciones. Las células transfectadas con el ARN del replicón mostraron una actividad del gen reportero indiferenciable de los controles negativos (células sin transfectar y sin extracto celular). Se repitió la determinación utilizando el doble del extracto celular con el mismo resultado.

El experimento volvió a realizarse, esta vez utilizando 2 µg de ARN por pocillo y midiendo la actividad del gen reportero a las 2, 6, 8 y 24 hs post transfección. Nuevamente el resultado de las transfecciones fue indiferenciable de los controles negativos. Este experimento se repitió tres veces con pequeñas variaciones no significativas

Para descartar que el problema fuera la transfección con ARN se recurrió a la co-transfección con un vector de expresión de la polimerasa T7. Para ello se utilizó 1 µg del ADN de pK-VFA:Luc linealizado, 0,5 µg del vector pT7 y 4 µl de DMRIE-C por pocillo (placas de 12 pocillos). El resultado fue nuevamente negativo, lo cual indicaría que el problema no radica en el ARN sintetizado *in vitro* o en la transfección del mismo.

Para descartar que el problema fueran los reactivos o el procedimiento de medición, se incorporó como control positivo un extracto celular de células transfectadas con un vector de expresión que posee el gen Luc bajo el control de un promotor de CMV (Dra. Nora López). Mientras que el control positivo mostró una actividad de alrededor de 15.000 unidades de luminiscencia, las muestras de pK-VFA:Luc fueron nuevamente negativas. Las mediciones se realizaron por triplicado y utilizando la configuración del luminómetro recomendada por el fabricante. En la Fig. 4.11.9 se presenta un gráfico confeccionado con los datos obtenidos de uno de estos experimentos.

Dado que, ya se ha demostrado la capacidad replicativa del sistema y la expresión de otras proteínas virales de la poliproteína que están río abajo del gen reportero, se concluyó que el problema podría estar en la capacidad intrínseca de expresión de Luc por parte del replicón, por lo que se estudio su modificación.

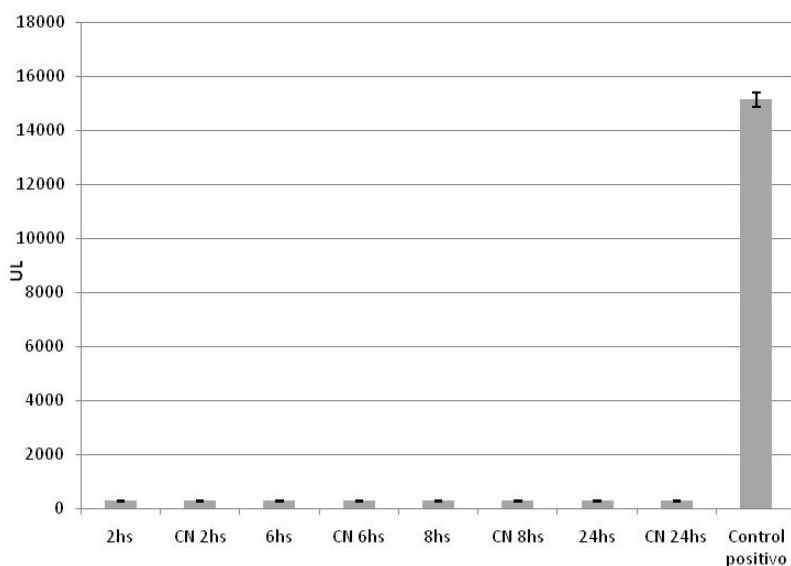


Figura 4.11.9 Ensayo de actividad del Luciferasa. La actividad de Luciferasa se midió en extractos de células transfectadas con VFA:Luc a las 2, 6, 8 y 24 hpt. Se muestran también el control de células sin transfectar para cada medición (CN) y un control positivo. Se indica el desvío standard. La actividad se midió como Unidades de luminiscencia (UL).

4.12. Modificación del replicón pK-VFA:Luc.

El diseño inicial del replicón fue hecho de forma tal que el gen Luc quedó fusionado a gran parte de VP0 en su extremo aminoterminal, y un segmento de VP1 en el carboxilo terminal. En el nuevo diseño se reemplazó la totalidad de las proteínas estructurales de VFA (VP0, VP3 y VP1) por el gen Luc, quedando éste solo fusionado a las secuencias de reconocimiento de las proteasas L^{pro} y $3C^{pro}$ (6 aa. en el extremo aminoterminal y 4 aa en el carboxiloterminal). La cantidad de aa a conservar en estos sitios de corte se decidió en base a lo publicado previamente por Glaser y cols. (2001) para L^{pro} , y Birtley y cols. (2005) para $3C^{pro}$. De esta forma, al producirse el clivaje co-traduccionales por parte de las proteasas virales, Luc quedará separado del resto de las proteínas virales, lo que debería permitir el correcto plegado de la proteína luciferasa.

En resumen: L^{pro} clivaría cotraduccionales liberando el extremo aminoterminal de la luciferasa, y posteriormente $3C^{pro}$ cortaría en el sitio de reconocimiento entre la luciferasa y la proteína 2A, lo que una vez acumulada cierta cantidad de $3C^{pro}$ en el citoplasma sucede rápidamente (Mahy, 2005).

Para construir el nuevo replicón se utilizó una técnica de PCR por solapamiento (OE-PCR) (Higuchi y cols., 1988) con la que se obtienen por PCR tres fragmentos que se solapan entre si en virtud de los *primers* diseñados para tal fin. Posteriormente se unen de a pares en un procedimiento similar a una reacción de PCR en ausencia de *primers*, ya que los segmentos se hibridizan entre si en la zona solapada (Fig. 4.12.1).

Los segmentos que conformaron el fragmento de reemplazo en el replicón terminado son: L^{pro} (amplificado con los *primers* AfIII-For y VP0-LucR), Luc (LucF y LucR) y P2 (2Afor y L2r).

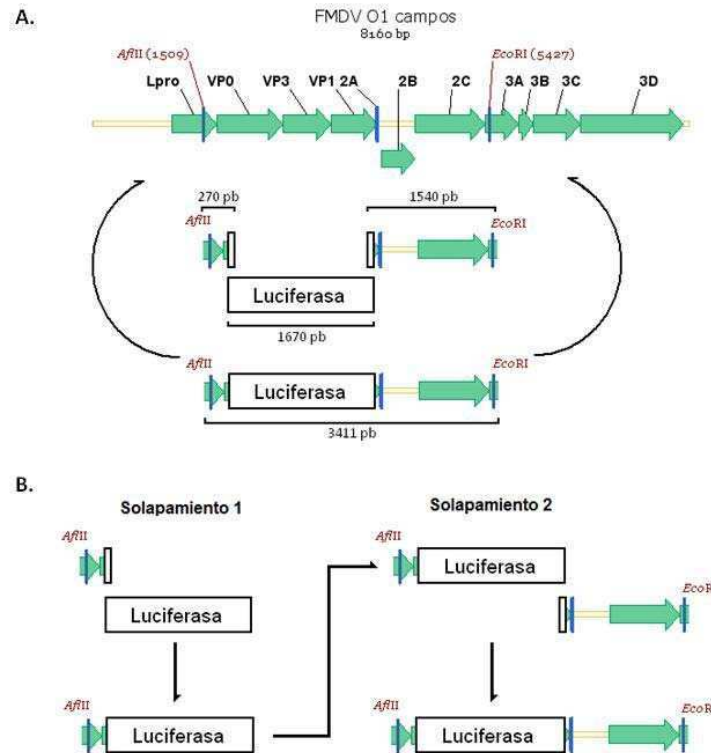


Figura 4.12.1. Esquema de la modificación del replicón. (A) Diagrama demostrativo de como se reemplazan las proteínas estructurales para la construcción del nuevo replicón. **(B)** Ilustración explicativa de como se solapan los fragmentos y el orden en que se ensamblan para generar el segmento de reemplazo de las proteínas estructurales.

4.12.1. Amplificación por PCR de los segmentos L^{pro}, Luc y P2 y fusión de los mismos por OE-PCR.

En la Fig. 4.12.2A se muestra una electroforesis con los productos de las PCR individuales realizadas para obtener estos segmentos. Posteriormente se los purificó, se los cuantificó por espectrofotometría y se realizó la primera reacción de solapamiento con los amplicones L^{pro} y Luc. En la Fig. 4.12.2B se muestra la foto de un gel donde se puede observar el cambio en el tamaño del amplicón entre una alícuota del gen Luc y una de la reacción de solapamiento entre L^{pro} y Luc. Posteriormente se aisló la banda de mayor tamaño de una electroforesis preparativa.

Una vez obtenida y cuantificado el amplicón L^{pro}-Luc se realizó la reacción de solapamiento entre L^{pro}-Luc y P2 (3411pb). En la Fig. 4.12.3A se muestra una electroforesis de una alícuota de dicha purificación. Por último, para enriquecer esa muestra con el fragmento

deseado se realizó una PCR con 0,5µg de esa construcción como templado utilizando los *primers* de los extremos (AflII-For/L2r), y realizando 10 ciclos de amplificación (Fig. 4.12.3B).

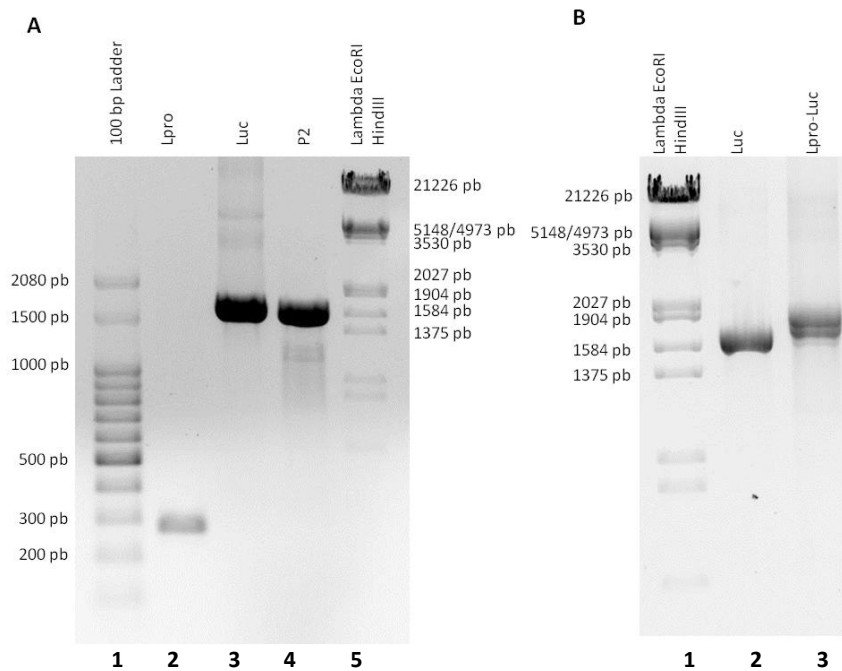


Figura 4.12.2. Amplicones de L^{pro}, Luc, P2 y OE-PCR entre los amplicones L^{pro} y Luc. (A) Productos de PCR de la amplificación de los segmentos L^{pro} (calle 2, 270 pb), Luc (calle 3, 1670 pb) y P2 (calle 4, 1540 pb). Calles 1 y 5: marcadores de PM. **(B)** La electroforesis muestra el cambio de tamaño luego de la reacción de solapamiento entre L^{pro} y Luc. Calle 1: marcadores de PM. Calle 2: Luc. Calle 3: L^{pro}-Luc.

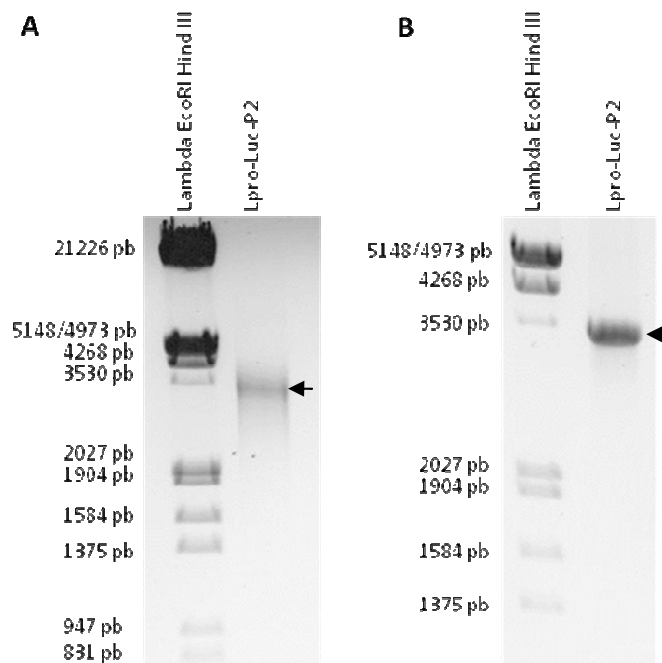


Figura 4.12.3. Fragmento L^{pro}-Luc-P2. (A) Fragmento final L^{pro}-Luc-P2 purificado. **(B)** Producto de PCR con los *primers* de los extremos de L^{pro}-Luc-P2 utilizando como templado el segmento aislado anteriormente. Las flechas indican el fragmento L^{pro}-Luc-P2.

4.12.2 Clonado del segmento L^{pro}-Luc-P2 en el esqueleto de pK-VFA\O1\Cam.

Como último paso se digirieron el fragmento L^{pro}-Luc-P2 y el clon pK-VFA\O1\Cam con las ERs AflII y EcoRI, se purificaron, se cuantificaron por absorbancia y se realizó una ligación entre ambos con 30 ng del clon *full length* y 1 µg del fragmento L^{pro}-Luc-P2, utilizando como control de religado una reacción con solo 30 ng del clon *full length* digerido.

Los plásmidos fueron mapeados por restricción. El análisis de la secuencia indicó el correcto ensamblado entre los 3 segmentos, así como con la secuencia viral (Fig. 4.12.4).



Figura 4.12.4. Alineamiento de las secuencias de aa de VFA O1/Campos, pK-VFA:Luc' y Luc. (A) La secuencia de la poliproteína de VFA empalma en el aa 228 con el extremo amino terminal de Luc, 6 aa río abajo del sitio de corte de L^{pro}. **(B)** El extremo carboxilo terminal de Luc (aa 550) empalma con el aa 932 de la secuencia de la poliproteína viral, a 6 aa del sitio de corte de 3C^{pro}. Los aa P y G entre la secuencia de la Luciferasa y VFA fueron incluidos para poder insertar un sitio de corte para ER que permitiera el clonado. En ambas posiciones los aa poseen características similares a los aa originales, también cabe aclarar que en esas posiciones se observa variabilidad al analizar las secuencias de distintos aislamientos.

Actualmente (al momento de escribir esta tesis) se envió a secuenciar la construcción completa mientras se está intentando obtener los ARNs transcritos del replicón para evaluar nuevamente la actividad del gen reportero en células transfectadas con el mismo.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo tuvo como objetivo primario generar un sistema para ser utilizado como herramienta en técnicas de genética reversa vinculadas al estudio del virus de la Fiebre Aftosa. La estrategia que se planteó fue partir de la cepa vacunal regional O1/Campos como modelo, de la que se tiene acceso a la secuencia completa, y diseñar un sistema original para el clonado de una copia en ADN del genoma completo, que se pudiera transcribir a partir del promotor de la polimerasa del fago T7, muy usada en estos casos.

La estrategia general de la construcción del clon de genoma completo está expuesta en los dos primeros ítems de la sección **Resultados (4.1.1 y 4.1.2)**.

El primer objetivo planteado, que fue el diseño y construcción de un clon de genoma completo del VFA basado en la secuencia de la cepa O1/Campos, se logró completar apelando a recursos originales y laboriosos, que se detallan y discuten en el texto del trabajo. La introducción de aspectos de **Discusión** de las alternativas dentro del texto de la Sección **Resultados** fue la forma más efectiva y enriquecedora que se encontró para ir explicando las decisiones tomadas sobre la marcha del trabajo, a medida que se encontraban, dificultades difíciles de prever *a priori*, por lo que no se repetirán en esta sección, para evitar redundancias.

El logro del segundo objetivo, esto es, generar virus infeccioso a partir de este clon, se enfrentó con múltiples limitaciones. El no poder trabajar con virus vivo en la institución por no contar con un laboratorio aprobado de bioseguridad de nivel NBS3 Agricultura (NBS4 OIE), dificultó la posibilidad de evaluación de un número mayor de alternativas en la capacidad del clon para generar virus infeccioso luego de transfección en células, así como repetir más sistemáticamente los experimentos en distintas condiciones y tiempos.

Justamente por estas limitaciones se encaró también la construcción de un replicón derivado del clon completo, mediante el reemplazo de la región codificante de las proteínas virales estructurales (P1) por el gen reportero de luciferasa (Luc), de modo de poder realizar estudios en laboratorios de nivel bioseguridad menos estrictos (tercer objetivo).

La primera estrategia de construcción de este replicón está explicada en el punto **4.11**, Parte II de la Sección **Resultados**. La segunda estrategia, ideada a partir de no lograrse expresión del gen reportero con el replicón anterior, se explica y fundamenta en el punto **4.12** de la misma Sección.

La evaluación del replicón en células BHK-21 se logró realizar finalmente en forma semicuantitativa por medición de ARN por RT-PCR en tiempo real (quinto objetivo), y quedó sin poder concretarse por problemas técnicos la medición por medio de actividad del gen reportero (cuarto objetivo).

A pesar de no haberse logrado en el término de tiempo de esta tesis la medición por Luc, la puesta a punto de una técnica de cuantificación de la síntesis de ARN a partir de estos clones por Real Time-PCR fue un aporte alternativo importante en este trabajo. La puesta a punto de esta técnica, si bien se eligió detallarlo con precisión en la Sección **Materiales y Métodos** (ítems **27.1** y **27.2**) para no interrumpir la fluidez de lectura de la tesis, se considera un aporte de importancia realizado por este trabajo.

Finalmente, la construcción de un replicón incapaz de generar viriones, pero que permita medir la actividad de un gen reportero incorporado en el *background* genómico del VFA, o bien la cuantificación del nivel de ARN viral por medio de RT PCR en Tiempo Real, permitirá evaluar los efectos de modificaciones en las proteínas virales o en las zonas no codificantes del genoma en un contexto fisiológico similar a una infección viral sin los riesgos asociados a la manipulación del virus.

5.1. Clon de genoma completo de la cepa O1/Campos

Una de las mayores dificultades a sortear fue la selección de un sistema (cepa bacteriana y plásmido) capaz de soportar en forma estable la copia de un genoma largo, con sitios de restricción adecuados, y la incorporación de un tracto de poli-citosinas de longitud adecuada para la viabilidad.

La amplificación del genoma se realizó en 4 grandes segmentos a través de RT-PCR que se unieron *a posteriori*, utilizando distintos plásmidos intermedios de acuerdo a los requerimientos de sitios de ER únicos disponibles en cada caso (pGEMT, pSFI, pBluescript SKII, pKF4). En particular el agregado de la secuencia de poli(C) de forma tal que no se generaran modificaciones en la secuencia viral demandó un diseño original, para lo que se subclonó un segmento pequeño en otro plásmido, se insertó un oligonucleótido doble cadena sintético utilizando dos sitios de restricción creados *ad hoc* y se volvió a clonar dentro de la copia original. El promotor T7^{pol} se insertó con uno de los primers en la región 5' del constructor. La construcción final quedó clonada en el plásmido pKF4, constituida por el promotor T7^{pol}, la secuencia del genoma de la cepa O1/Campos (8.267 nt) precedida por dos guanosinas, y un

sitio de restricción EcoRV para la linealización al final de la secuencia de poli(A). La linealización con EcoRV deja solo dos nucleótidos agregados a la cola de poli(A) (Figura 5.1).

El largo del tracto de poli(C), es de 20 nucleótidos, y está dentro del rango de longitud reportada para los clones de la cepa A12, donde se demostró que se pudo generar virus infeccioso con trectos de poli(C) de entre 2 y 35 nucleótidos (Rieder y cols., 1993).

La introducción de la secuencia del promotor de T7^{pol} incluyó la adición de dos G (secuencia no viral) antes de la secuencia genómica de VFA, para mayor eficiencia del mismo (Milligan y cols., 1987). Se ha encontrado en general que la presencia de secuencias no virales en el extremo 5' ha resultado en reducción de la infectividad viral (Heaton y cols., 1989; Dore y cols., 1990), pero ha sido también demostrado en otro estudio que dos residuos G extras no afectaron la infectividad del ADNc de la cepa de VFA OH99 (Liu y cols., 2004).

La región 3'NC incluyendo el tracto de poli(A) en el extremo 3' de los transcritos puede jugar también un rol importante permitiendo o no la hibridación con 3B-pUpU para permitir la síntesis de la cadena negativa del genoma viral (Barton y cols., 1995; Saiz y cols., 2001). Los cambios puntuales en 3'NC con respecto a la secuencia reportada son cuatro y fueron analizados en particular mientras la longitud requerida de este tracto de poli(A) no se conoce a ciencia cierta y en este caso se usaron 20 residuos A.

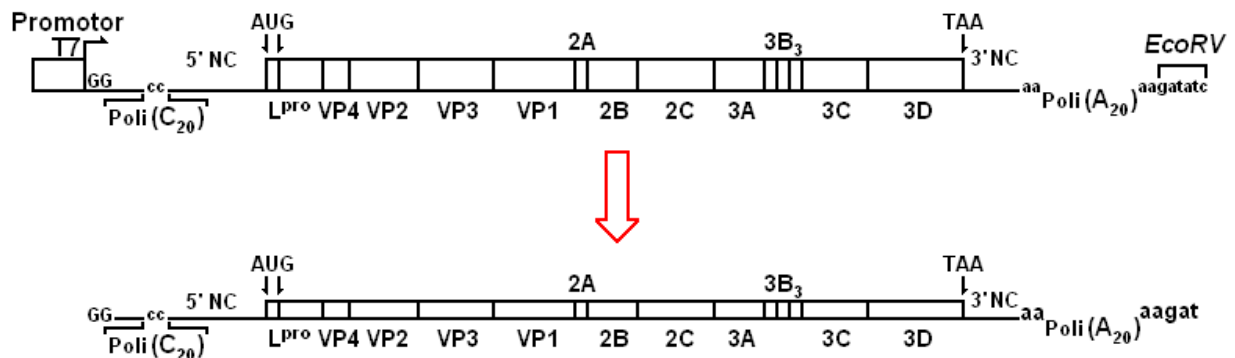


Figura 5.1. Esquema de la construcción final de pK-VFA/O1/Cam. En el panel inferior se muestra el esquema de la cadena positiva transcrita a partir de la misma, luego de la linealización con EcoRV.

Luego de la transfección del plásmido pK-VFA/O1/Cam en células que expresan T7^{pol}, o de los transcritos en células BHK21, las células no mostraron lisis, indicando que el virus no es estable o que los transcritos del ADNc no son infecciosos.

A pesar de haberse obtenido la secuencia completa de la construcción antes de la transfección, una segunda secuenciación utilizando *primers* distintos diseñados *ad hoc* permitió detectar un error (delección de una guanosina) que pudo haber sido una de las causas responsables de la no generación de virus infectivo en los primeros intentos. La metodología utilizada en un principio había consistido en la secuenciación de las dos mitades del clon (construcciones pK-L2-3 y pB-SL1pC) y, una vez ensamblado el clon completo, se secuenciaron las zonas de unión, así como otras zonas que no habían sido cubiertas en la secuenciación parcial de las mitades por separado. Eventualmente la aparición de la mutación podría deberse a la manipulación de los ADNs durante el subclonado que al ser reparado dentro de las bacterias se realizó de forma ineficiente. También puede haberse producido por la utilización de la cepa de *E. coli* DH10 β , dado que está reportado que dicha cepa posee una tasa de mutación 13,5 veces mayor que la de la cepa MG1655 de la cual fue derivada (Durfee y cols., 2008). Adicionalmente, se reporta la detección de transposones con muy alta frecuencia de transposición, lo cual genera alteraciones en la secuencia en que se inserta, aun después de escindida de la misma. Dicha inestabilidad en la cepa DH10 β ha sido confirmada por el trabajo de Astua-Monge y cols. (2002).

Sin embargo, la corrección de esta delección tampoco permitió obtener virus que produjera efecto citopático en células, si bien se obtuvo evidencia de replicación de ARN, por detección de la hebra negativa de ARN.

En el análisis de la secuencia de pK-VFA/O1/Cam, como era esperable, se encontraron muchos cambios puntuales en relación a la secuencia de la cepa O1/Campos depositada en el *Genbank*, lo que es normal en el caso de los virus a ARN que poseen altas tasas de mutación y que constituyen lo que se denomina una cuasiespecie. Cada una de las mutaciones encontradas fue analizada entonces en forma individual tratando de encontrar una explicación a la ineficiencia en la generación de virus.

En las regiones no codificantes se analizaron las posiciones y motivos conservados de ARN en zonas definidas como críticas en trabajos de genómica de VFA y en la zona codificante se analizó la estructura de las proteínas por modelado utilizando los programas de SWISS-MODEL Workspace. Ambos aspectos están discutidos en detalle en los ítems **4.8** y **4.9** de **Resultados**, a los cuales se remite, por lo que no se repetirá en esta sección.

Si bien el análisis realizado en tracto 5'NC del clon pK-VFA/O1/Cam indicó que ninguno de los cambios se ubica en zonas altamente conservadas (sección **4.8.1**), al realizar una predicción de la estructura secundaria del IRES utilizando el software Mfold (Zuker, 2003) se

encontró que la combinación de dos de las mutaciones (T696 y T706) impedirían la formación de un *hairpin* observado en el ARN de la cepa O1/Campos. Cabe aclarar que dicho *hairpin* no está reportado entre los motivos o las estructuras con alto nivel de conservación (Carrillo y cols., 2005), y que, adicionalmente, al realizar la predicción de la estructura secundaria del IRES del aislamiento O1/Kaufbeuren, tampoco se observó la formación de dicho *hairpin* (los nt en la secuencia de O1/Kaufbeuren en ambas posiciones coinciden con la del clon pK-VFA/O1/Cam). Por esta razón, no se puede establecer la relevancia de la ausencia de esa estructura en la ausencia de infectividad del clon. La predicción de las estructuras secundarias anteriormente mencionadas se presenta en el Anexo V.

En función del análisis realizado, tres de estas mutaciones aminoacídicas (N46D en L^{pro}, A111T en VP2 y L460R en 3D^{pol}) se estudiaron en particular y se revirtieron en pK-VFA/O1/Cam, una por vez, para detectar el fenotipo resultante. Sin embargo ninguno de los revertantes mejoró el fenotipo inicial de ausencia de ECP en células BHK-21.

Varios clones de ADNc infecciosos han sido construidos y caracterizados, entre ellos de las cepas O1K (Zibert y cols., 1990), A12 (Rieder y cols., 1993), OH99 (Liu y cols., 2004) y SAT2 (ZIM/7/83) (van Rensburg y cols., 2004). Otros, como el de la cepa vacunal IND 63/72 (serotipo Asia 1), no han generado efecto citopático en células, a pesar de detectarse expresión las proteínas virales en ensayos *in vitro* (Saranavan y cols., 2010). Asimismo, se ha reportado la construcción de clones completos de genomas virales que resultaron ser no infectivos (Rice y cols., 1989; Sumiyoshi y cols., 1992; Lai y cols., 1991; Quillet y cols., 1989; MacFarlane y cols., 1991; Skotnicki y cols., 1993). En algunos casos solo se logró obtener transcritos con capacidad infectiva cambiando la cepa de *Escherichia coli* utilizada o el plásmido en que se encontraba clonado el ADNc, y en otros casos obteniendo los transcritos de ARN por la transcripción *in vitro* directamente del producto de la ligación de las mitades del ADNc (evitando el clonado en plásmidos y la amplificación en bacterias).

En el caso clon completo de VFA Asia 1 IND 63/72, del cual no obtuvieron transcritos con capacidad infectiva (Saravanan y cols., 2011), este fenotipo se pudo revertir tras re-amplificar el segmento 5'NC y reemplazarlo conformando un clon quimérico (Gopinath y cols., 2012). En otros casos la posibilidad de restaurar la infectividad por intercambio de alguna región por otra correspondiente de un ADNc independiente también ha sido reportada (Boyer y Haenni, 1994).

A pesar que la obtención de la copia del genoma completo y de los transcritos correspondientes es un paso crucial, eso no necesariamente asegura actividad biológica. La infectividad de los transcritos es variable, pudiendo algunas veces ser del 100% comparado

con la infectividad del ARN del virus salvaje. Para obtener infección productiva, los transcritos deben interactuar con las proteínas virales y particularmente con la replicasa viral y con componentes de la célula huésped, como la maquinaria de traducción. Por lo tanto la estructura de los transcritos virales tiene que simular la del ARN del virion lo más próximamente posible. Muchos parámetros tienen una gran influencia en la infectividad de los transcritos, como la heterogeneidad de la población de ARNs, las secuencias en las regiones terminales 5' y 3' y su compatibilidad con la secuencia de la zona codificante. Debido a la relativamente deficiente fidelidad de las enzimas que sintetizan ARN, mutaciones originadas en los experimentos *in vitro* son esperables, especialmente en genomas largos. Se ha reportado que la alteración de las secuencias puede resultar de los experimentos de transcripción *in vitro* de los ADNc dado que se observó que la fidelidad de las polimerasas T7 y SP6 es dependiente de la secuencia (Kuhn y cols., 1990). Adicionalmente, Boyer y Haenni (1993) recalcan la inestabilidad de los ADNc de genomas virales en bacterias, y ejemplifican casos de clones completos de virus con genomas de ARN de cadena positiva en los cuales dicha inestabilidad produjo la introducción de mutaciones que resultaron en la no infectividad de los transcritos obtenidos.

Como se sabe, las poblaciones de virus de fiebre aftosa constituyen una cuasi especie, dada la alta tasa de mutación y la gran variabilidad observada, siendo esperable la aparición de genotipos no viables en la población. Por lo tanto podría darse el caso de que el clon generado de ADNc fuera el resultado de la fiel transcripción reversa y amplificación del ARN viral, ARN que a su vez fuera una versión mutada, incapaz de replicar (o impedido para realizar otras funciones del ciclo viral) y que posiblemente sería eliminado en la próxima ronda de replicación. Como consecuencia, este ADNc o su resultante ARN no serían infecciosos.

En un trabajo reciente, Morelli y cols. (2013) estudiaron la variabilidad intra-muestra en VFA, allí demuestran que en una misma muestra de VFA hay una gran heterogeneidad de subpoblaciones, y concluyen que la utilización de secuencias consenso no refleja la realidad de las subpoblaciones virales que la componen. A pesar de esto, no existe una alternativa al uso de secuencias consenso al momento de analizar la secuencia genómica de VFA, lo que hace imposible la diferenciación de mutaciones debidas a la enorme variabilidad demostrada por las cuasiespecies de aquellas que puedan haber surgido como un error al momento de la retrotranscripción y la amplificación por PCR.

Con respecto al fenómeno de aparente transmisión de ARN de VFA en ausencia de ECP, Escarmís y cols. (2008) lograron obtener varios sub-clones no citolíticos de VFA derivados del clon C-S8c1 (proveniente del aislamiento C-Sta.Pau Sp/70) pasajes seriados de placa a placa

que desarrollaron un fenotipo de ausencia de ECP pero competentes replicativamente, estableciendo una infección de tipo persistente en cultivos de células BHK-21. Este hallazgo deja abierta la posibilidad de que las mutaciones presentes en pK-VFA/O1/Cam puedan producir un fenotipo similar, aunque verificar esta posibilidad requeriría realizar un número mucho mayor de pasajes para poder verificar que hay transmisión del ARN de VFA en pasajes sucesivos a pesar de la ausencia de ECP, para lo cual se deberá tener acceso a un laboratorio de bioseguridad de nivel NBS3 Agricultura (NBS4 OIE) por períodos más prolongados.

Por último, debemos recalcar la dificultad de identificar el efecto biológico y el origen de las mutaciones observadas al construir un clon completo de una cuasi-especie como VFA. Si bien *a priori* suponemos que la (o las) mutaciones que puedan suprimir la infectividad del mismo se deben a errores durante la retrotranscripción o la amplificación por PCR (u otros artefactos generados en la construcción del clon), se han reportado poblaciones virales compuestas mayoritariamente por genotipos defectivos, que solo son infectivos por complementación. En dos publicaciones (García-Arriaza y cols., 2004 y 2006), los autores reportan poblaciones de VFA en las cuales los genotipos dominantes eran genomas defectivos obtenidos de pasajes seriados a altas multiplicidades de infección, genomas que poseían deleciones, que se complementaban entre sí. En dichos trabajos se demuestra que dos o más genomas defectivos logran completarse y producir una infección lítica en ausencia de un genoma estándar. Prolongando este tipo de pasajes a altas MOI, los investigadores obtuvieron poblaciones donde los genomas defectivos se encontraban en cantidades 10.000 veces más altas que los genomas competentes.

Si bien no creemos que en nuestro caso la muestra utilizada para la amplificación del genoma viral por RT-PCR se corresponda con lo expuesto por García-Arriaza y cols. (2004, 2006) existe la posibilidad de que en las poblaciones virales haya mutantes defectivos (por una o más mutaciones puntuales) que sobreviven por complementación con genomas competentes (o que sufren mutaciones adicionales que revierten el fenotipo y los hacen viables). Si se tiene en cuenta que para la construcción del clon se selecciona solo uno de los amplicones clonados para proseguir con la construcción, la combinación de amplicones provenientes de genotipos diferentes que componen la población, puede generar un clon que posea una mutación deletérea y que no posea las mutaciones adicionales necesarias para revertir su fenotipo, y que adicionalmente no contará con otros genomas que lo complementen al realizar las transfecciones con los ARNs derivados del mismo.

Se concluye que, a pesar del esfuerzo realizado en esta tesis, se necesita aún más trabajo a nivel molecular y celular para poder avanzar en la obtención de virus infeccioso.

5.2. Clon replicón que porta el gen reportero Luciferasa.

Distintos replicones fueron construidos con picornavirus portando genes reporteros. En el caso del VFA, Mason y cols. (2002) reemplazaron toda la zona de proteínas capsidales por el gen de beta-galactosidasa, y otros investigadores reemplazaron distintas porciones de la misma por el gen CAT (McInerney y cols., 2000; Belsham y cols., 1999). En todos los casos se realizó la delección de casi toda L^{pro}, lo cual no influyó negativamente en la replicación, y la introducción de un gen reportero fusionado a un segmento de VP1 no afectó el funcionamiento del mismo.

Considerando estos resultados previos, la opción elegida en este trabajo para el gen Luc fue dejar L^{pro} intacta, dado que el replicón será utilizado para estudiar la biología de VFA y L^{pro} interviene en numerosos aspectos del ciclo viral (de los Santos y cols., 2006; Devaney y cols., 1998; Piñeiro y cols., 2012; Wang y cols., 2011 a, b; Belsham, 2013).

El gen Luc fue inicialmente fusionado a la poli-proteína dejando la secuencia codificante de L^{pro} y parte de la de VP0 en la zona amino terminal, y una parte de VP1 en la zona carboxi terminal. Si bien se detectó replicación de ARN por RT PCR (hebra negativa) no hubo expresión del gen reportero luego de transfección en células.

Es dable interpretar que, o bien la secuencia de VP0 interfiere con el correcto plegamiento de las secuencias ubicadas río abajo o el plegamiento de la proteína del gen luc tiene una mayor restricción que CAT (y que β -galactosidasa) a la fusión a otras secuencias (ya sea en el extremo amino o carboxilo terminal). Otro dato a tener en cuenta es la baja solubilidad reportada para la proteína VP1 (Strebel y cols., 1986; Wang y cols., 2003) y más precisamente de su mitad carboxi-terminal (Bayry y cols., 1999). El efecto que esto pueda tener sobre el plegamiento y la solubilidad de la proteína de fusión a Luciferasa es incierto, pero creemos que no debería ser descartado como una de las posibles causas de la falta de actividad del gen reportero.

Cualquiera sea el caso, para utilizar el replicón para cuantificar la síntesis de Luciferasa, la construcción fue rediseñada, eliminando casi todas las secuencias codificantes de las proteínas capsidales del VFA. Para este nuevo diseño solo se conservaron los aa que conforman los sitios de corte para las proteasas L^{pro} y 3C^{pro} (ítem **4.12**).

La construcción del nuevo replicón fue terminada, pero los experimentos de expresión de Luc y la prueba de su capacidad de funcionar como reportero de la actividad de replicación

es un trabajo que aún está en curso en el laboratorio como continuación del trabajo de esta tesis.

A continuación se muestra el esquema de las dos versiones de replicones construidas:

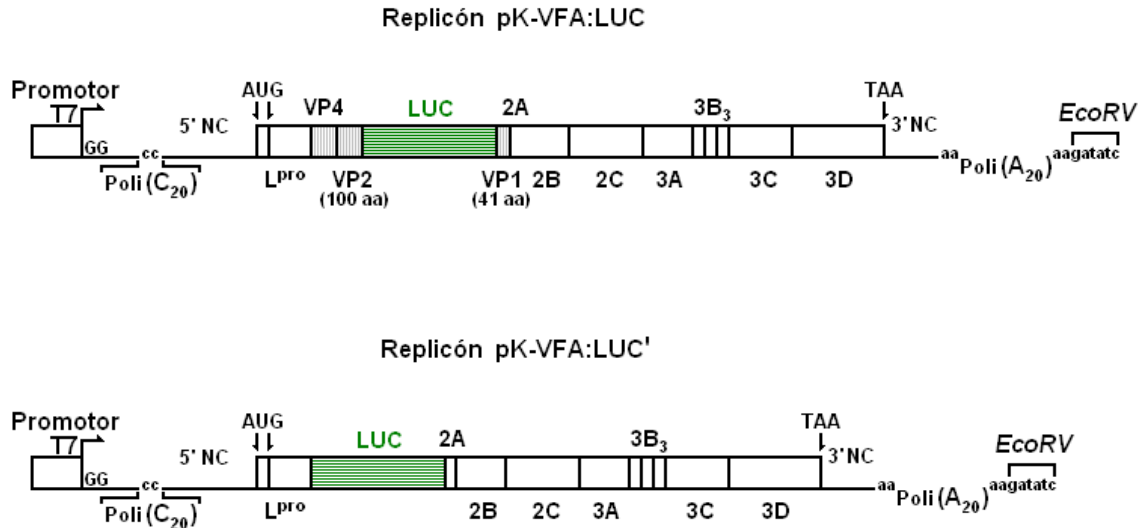


Figura 5.2.: Esquema de los dos replicones generados a partir de pK-VFA/O1/Cam. En cada caso se reemplaza en forma parcial o completa la región de la zona codificante de las proteínas capsidales por el gen reportero luciferasa, dando lugar a pK-VFA:LUC y pK-VFA:LUC', respectivamente .

La disponibilidad de un replicón incapaz de generar viriones, pero que permita medir la actividad de un gen reportero incorporado en el *background* genómico del VFA o la cuantificación del nivel de ARN viral por medio de RT PCR en Tiempo Real, permitirá evaluar los efectos de modificaciones en las proteínas virales o en las zonas no codificantes del genoma en un contexto fisiológico similar a una infección viral sin los riesgos asociados a la manipulación del virus.

5.3. Conclusiones del trabajo

1. Se generó una herramienta basada un clon genómico completo en ADN (pK-VFA/O1/Cam) del que pudo transcribirse ARN genómico a partir del promotor de la T7^{pol} luego de linealización con la ER adecuada.
2. No se logró demostrar la capacidad del clon de generar virus infeccioso a partir de generación de efecto cito patico luego de transfección en células BHK-21 o pasajes sucesivos.
3. Se identificaron algunas posibles causas de esta incapacidad, se valoraron en su posible significancia y se analizaron una a una bajo distintas ópticas, tales como influencia de mutaciones en la secuencia amino acídica, en la estructura secundaria del ARN, en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas involucradas, estudio de la bibliografía y bases de datos de secuencias, entre otros.
4. Se generaron reversiones de las mutaciones que se consideraron más importantes en base a este análisis y se reintentó sistemáticamente la generación de virus infeccioso.
5. Se logró detectar replicación del genoma viral por identificación de ARN de cadena negativa en las células transfectadas y en pasajes sucesivos de éstas.
6. A pesar de detectar replicación del genoma viral, no se observó generación de efecto citopático en células BHK-21.
7. Se puso a punto un sistema de cuantificación de ARN por RT PCR en Tiempo Real.
8. Se generaron dos replicones mediante el remplazo parcial y/o completo de las proteínas de la cápside viral por el gen Luc, incapaz de generar virus infeccioso, pero apto para medición de replicación por RT-PCR en Tiempo Real. Este sistema puede usarse para el estudio funcional de las proteínas no estructurales del virus, así como de las regiones 5' y 3' no codificantes.
9. Se logró detectar replicación del replicón por identificación de ARN de cadena negativa en las células transfectadas.
10. Se logró detectar traducción de proteínas virales por medio de técnicas de inmunofluorescencia indirecta, tanto con anticuerpos policlonales como con anticuerpos monoclonales.
11. Al tiempo de finalizar esta tesis se pudo medir replicación por RT PCR Tiempo Real, pero la optimización de los experimentos de expresión del gen Luc están aún en curso.

6. ANEXOS

ANEXO I

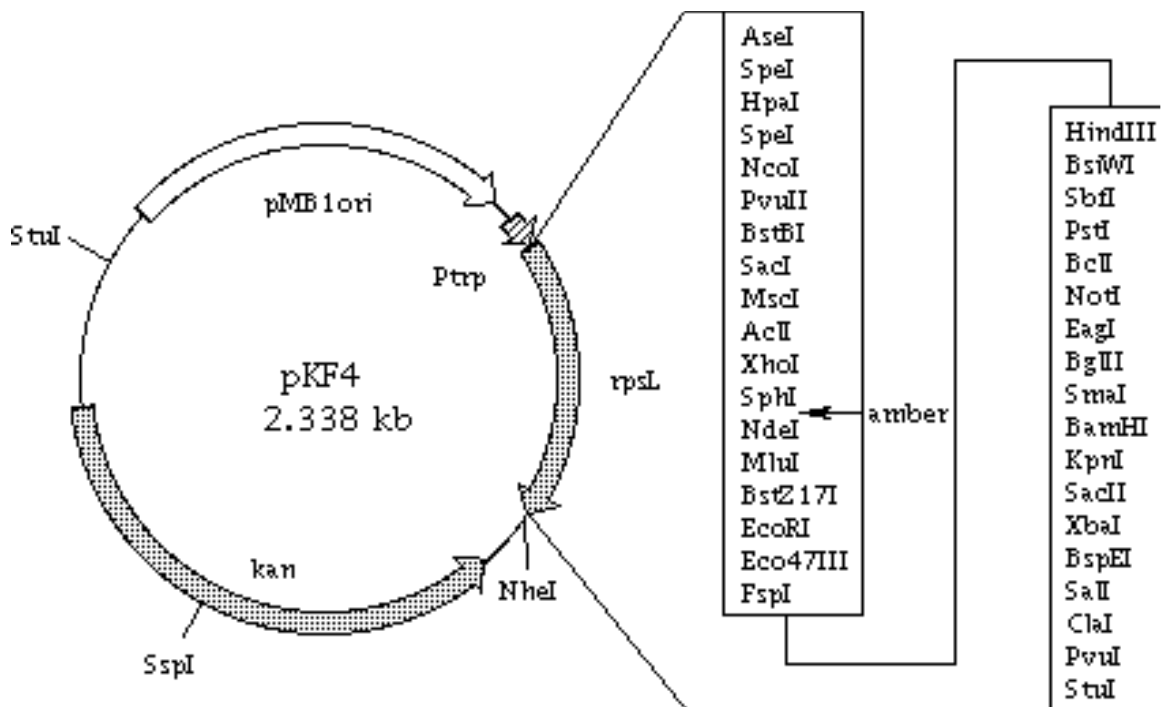
Listado de primers utilizados en el trabajo.

Denominación	Secuencia (5'-3')
1445Rev	ATCCACCATGCACACCTCGCT
2Afor	TCGCCGTGCCCGGGCCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCT
3ABBB-Rev	AAATGGATCCTTACTCAGTGACAATCAGGTTCT
3AG-F	GAAGATCTGCCACCATGATCTCAATTCCTTCCCA
3AG-R	GACGGATCCTCAGCTTGTGGTGTCTCCTCAACAG
3Ast-Rev	ATTAGGATCCCTATTCAGCTTGTGGTGTCTCCTCAACAG
3CRev	TAATGGATCCTACTCGTGGTGTGGTTCGGGGTCAAT
AfIII-For	CAGCGAGGTGTGCATGGTGGATGGTA
Bpil-for(C)	TTCACCCCCCCCCCCCCCCCCC
Bpil-rev(G)	CCTAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
C_1_L1r-1	TGAGGGAAAAGTGTGAGCTG
C_L2f-1	TGCAGGTACAGCAGAAATGC
C_L2r-1	GGTGAAGTGGGTGGAAATTG
C_pkf4_R400-1	CTTTGAGGCCATCACAGGTT
C_Reta_F5200-1	GGTCCGATGGAGAGACAGAA
Clon2_L2f-1	TGCAGGTACAGCAGAAATGC
Corr3D-F	CAGATCACTTTACCTGCGTTGGGTGAACG
Corr3D-R	CGTTCACCCAACGCAGGTAAAGTGATCTG
CorrL-F	CCTTTTACTCCAGGCCCAACAACCACGACAACCTGC
CorrL-R	GCAGTTGTCTGTGGTTGTTGGGCTGGAGTAAAGG
CorrVP2-F	GTCGAGGTCACCGCGGTTGGCAACCAG
CorrVP2-R	CTGGTTGCCAACCAGCGGTGACCTCGAC
F-5059	TCACCCCGAGGACTATGGTGTGT
F5200	TGGCAATGTTTCAATACGACTGT
forw6226	GCAGAGCCATGACAGACAGT
forw6629	CCAGGTCCATGCTTCTTA
GDH196-177R	CATACTCGGCACCAGCATCA
GDH85-105F	GGCACAGTCAAGGCTGAGAAC
L1-For	ACTAGTGAAGACCCTAGGTTTTACCGTCATTCCC
L1r	AGTTCAACCCAGTGTCCCATTAG
L2f	CGAAGGCGGTTACATGATTGCCTA
L2r	TGAGGGGTCGGAGTTCCTCTTTGAT
L3-For	GTGTTGTACTTTCTCATTGAGAAGGGCCA
Luc-F	CAATCCAGTATGGAAGACGCCAAAAACATAA
Luc-R	TTTACCGGCCCGGGCACGGCGATCTTCCGCCCTTCTT
Nsil-Luc-For	TATGCATATATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
Panaf-LMR	GACATGTCCTCCTGCATCTG
Panaf-Odir	ACCAACCTCCTTGATGTGGCT
pkf4-F2232	CCAGCAACGCGGCTTTTTACGGT
pkf4F-F	CCCCCTAGGTTTTACCGTCA

Denominación	Secuencia (5'-3')
pkf4F-F-1	CGCTTTGGTACAGGCTATCAG
pkf4F-R	GAAAACGGGCAAAACCTGTGT
pkf4_R405	GACGGGACGGCGGCTTTGTTGA
PolyT_EcoRV	CCCCGCGGATATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Real-Rev5298	CTCGACCCGATCAATCACCT
rel-r1806	TTAGAGCCTCCACTGATTGCGT
Rev4665	CTGGGGCGACCACTTTACACA
S-Rev	ACTAGTAGAAGACAATGAAAGGCGGGCGTCGGGT
S-T7-For	ACTAGTTAATACGACTCACTATAGGTTGAAAGGGGGCGCTA
Secuen-3Ar	GAGTTCTCTCTCTAAAGCCAACGGT
VFA-f3764	CAACTACGGTGCCATCAAAGCGA
Vp0-Luc-R	TGGCGTCTTCCATACTGGATTGTCCAGCCCCCTTGA
XmaI-Luc-Rev	TAGACCCGGGTCACGGCGATCTTCCGCCCTTCTTG

ANEXO II

Mapa de los plásmidos utilizados.

pKF4

Número de acceso en base de datos: D45833

Versión: D45833.1 GI:1199492

Publicado en: Hashimoto-Gotoh,T., Tsujimura,A. and Ogasahara,Y. Detection of exonuclease activities in restriction endonuclease preparations using an enforcement plasmid for kanamycin-resistance selection. Gene 164 (1), 41-44 (1995)

Resistencia a antibióticos: Kanamicina

Origen de replicación: pMB1 ori

Secuencia:

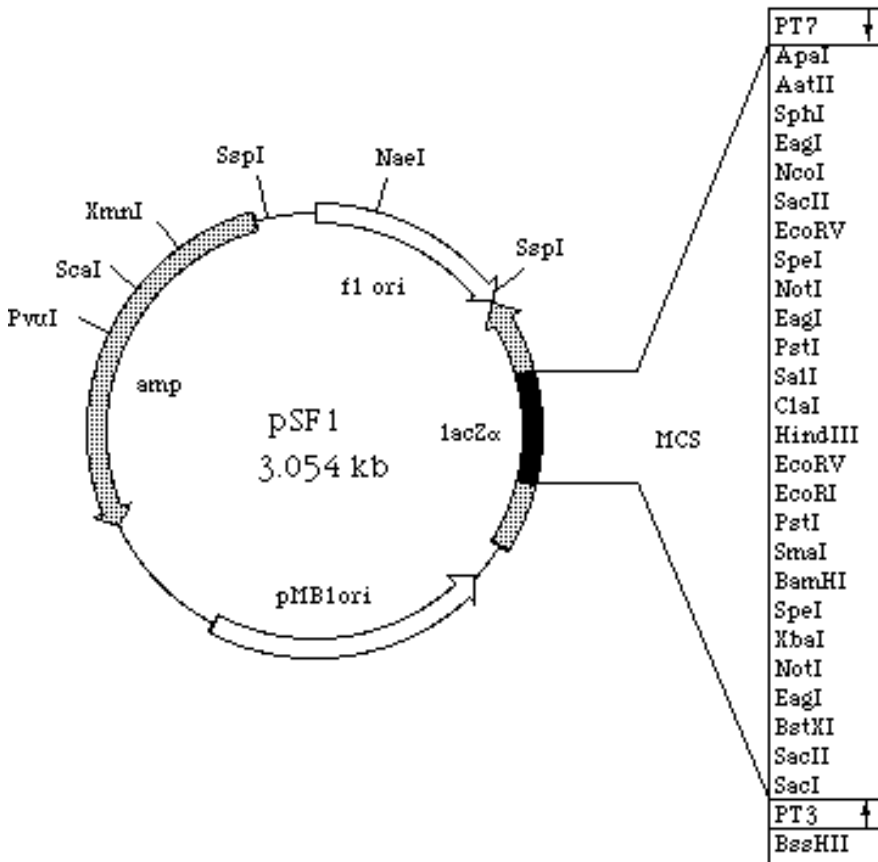
```

1 atggcaacag tcaatcagct ggttcgaaag ccgcgagctc gtaaagtggc caaatctaac
61 gttccggctc tcgaggcatg cccgtagaag cgtggcatat gcacacgctg atacactact
121 actccgaaga aaccgaattc agcgctgctc aagctttgcc gcgtacgctt gaccaacggt
181 ttcgaggta cctcatatat aggtgggtgaa ggacacaacc tgcaggaaca ctctgttacc
241 ctgatcagag gcggccgctg taaagatctg cccgggatcc ggtaccacac cgtccegggc
301 gctctagact gctccggagt aaaggaccgt cgacaggatc gatcgaaata cggtgtaaaa
361 cgtccgaagg cctaatagaa gctagcttgg cgaatgcgat ttattcaaca aagccgccgt
421 cccgtcaagt cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga
481 aaaactcadc gagcatcaaa tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat
541 atttttgaaa aagccgtttc tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga
601 tggcaagatc ctggtatcgg tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatca
661 atttccctc gtcaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat
721 ccggtgagaa tggcaagagc ttatgcattt ctttcagac ttgttcaaca ggccagccat
781 tacgctcgtc atcaaaatca ctgcgatcaa ccaaaccgtt attcattcgt gattgcgctt
841 gagcgagacg aaatacgcgg tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca
901 accggcgcag gaacactgcc agcgcatcaa caatattttc acctgaatca ggatattcct

```

961 ctaatacctg gaatgctgtt tttccgggga tcgcagtggt gagtaacat gcatcatcag
1021 gagtacggat aaaatgcttg atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc
1081 tgaccatctc atctgtaaca tcattggcaa cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact
1141 ctggcgcacg gggcttccca tacaaccgat agattgtcgc acctgattgc ccgacattat
1201 cgcgcgcccc tttataccca tataaatcag catccatgtt ggaatttaat cgcggcttcg
1261 agcaagacgt ttcccgttga atatggctca taacaccctt tgtattactg tttatgtaag
1321 cagacagttt tattgttcat gatgatatat ttttatcttg tgcaatgtaa catcagagat
1381 tttgagacac aacgtggctt tgttgaataa atcgaacttt tgctgagttg aaggatcaga
1441 tcacgcatct tcccgacaac gcagaccgtt ccgtgcgtgg ctccctcact ttctggctgg
1501 atgatggggc gattcaggcc tggatgagt cagcaacacc ttcttcacga ggcagacctc
1561 tcgacggatc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag
1621 atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg
1681 tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca
1741 gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga
1801 actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca
1861 gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc
1921 agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca
1981 ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa
2041 aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc
2101 cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc
2161 gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg
2221 cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca attctgaaat gagctgttga
2281 caattaatca tcgaactagt taactagtac gcaagttcac gtaaaaaggg tatcgacc

pSF1



Número de acceso en base de datos: AF067142

Versión: AF067142.1 GI:3169654

Publicado en: Sage,D.R., Chillemi,A.C. and Fingeroth,J.D. A versatile prokaryotic cloning vector with six dual restriction enzyme sites in the polylinker facilitates efficient subcloning vectors with unique cloning sites. *Plasmid* 40 (2), 164-168 (1998)

Resistencia a antibióticos: Ampicilina.

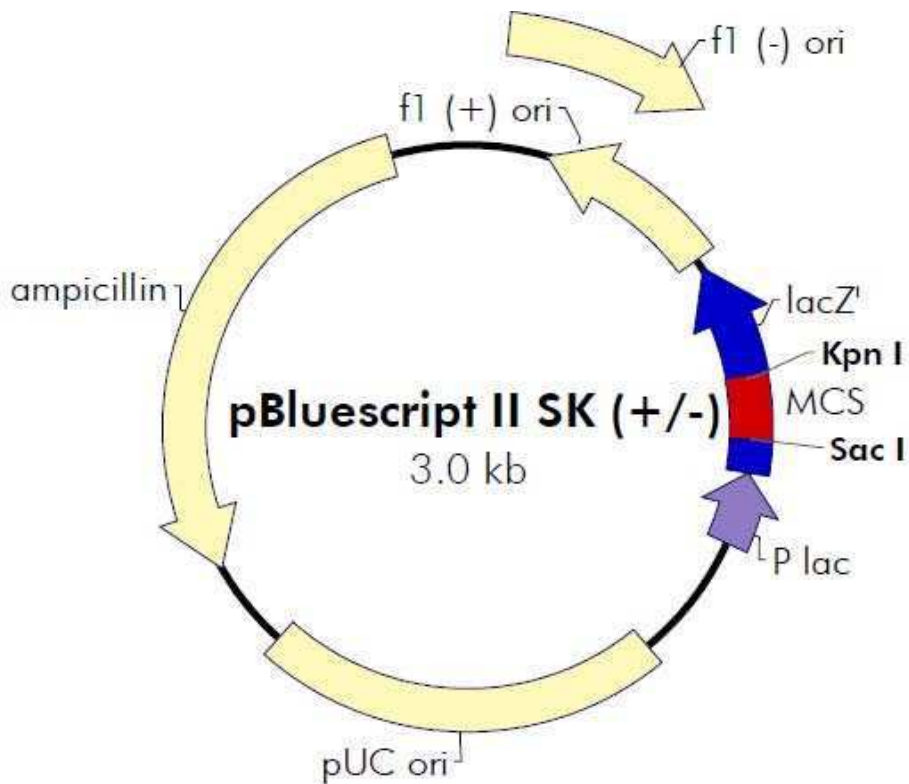
Origen de replicación: pMB1 ori

Secuencia:

```

1 taatacgact cactataggg cgaattgggc cgcacgtcgc atgctcccgg ccgccatggc
61 cgcggggat cactagtgcg gccgcctgca ggtcgacggt atcgataagc ttgatatcga
121 attcctgcag cccgggggat ccactagttc tagagcggcc gccaccgcgg tggagctcca
181 gcttttgttc cctttagtga gggttaatt
    
```

(Solo se ha publicado en las bases de datos la secuencia del *polylinker*)

pBluescript SK II +

Número de acceso en base de datos: X52327

Versión: X52327.1 GI:58061

Publicado en: Altling-Mees, M.A. and Short, J.M. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* 17 (22), 9494 (1989)

Plásmido comercial, propiedad de Statagene.

Resistencia a antibióticos: Ampicilina.

Origen de replicación: pUC ori

Secuencia:

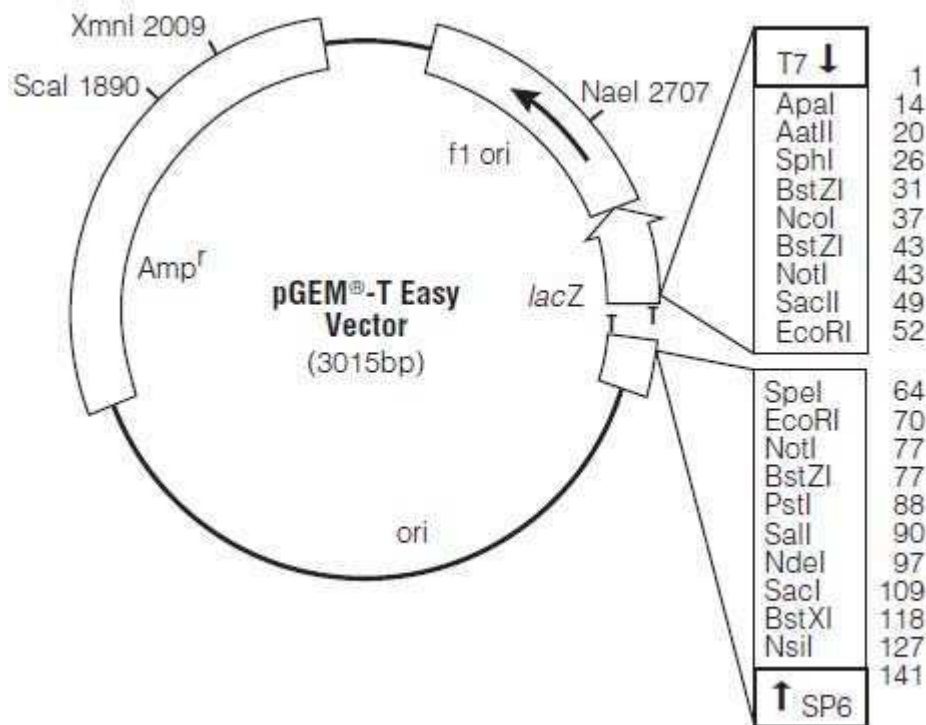
```

1 ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgta aatTTTTgtt aaatcagctc
61 atTTTTtaac caataggcgc aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga
121 gataggggtg agtgttgttc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc
181 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc
241 ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccc taaagcacta aatcggaaac ctaaagggag
301 cccccgattt agagcttgac ggggaaaagg ggcgaacgtg gcgagaaaag aagggaaaga
361 agcgaaggga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac
421 cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcy
481 caactgttgg gaaggcgat cggtgccggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaaag
541 gggatgtgct gcaaggcgat taagtggggt aacgccaggg ttttcccagt cagcagcttg
601 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tggagctcca
661 ccgcgggtgc ggcgctcta gaactagtgg atccccggg ctgcaggaat tcgatataca
721 gcttatcgat accgctgacc tcgagggggg gcccggtacc cagcttttgt tccctttagt
781 gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaattgtt
841 atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg
901 cctaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg
961 gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc
1021 gtattgggcy ctcttcgctc tctcgcctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc

```

1081 ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata
 1141 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg
 1201 cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct
 1261 caagtccag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa
 1321 getccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttc
 1381 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg
 1441 aggtcgctcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg
 1501 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaaag acacgactta tcgccactgg
 1561 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgtg aggcgggtgct acagagttct
 1621 tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc
 1681 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg
 1741 ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc
 1801 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt
 1861 aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa
 1921 aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggctctgac agttaccaat
 1981 gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct
 2041 gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgcg
 2101 caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag
 2161 ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta
 2221 attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg
 2281 ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg
 2341 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct
 2401 ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta
 2461 tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgctt tctgtgactg
 2521 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc
 2581 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg
 2641 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga
 2701 tgtaaccacc tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg
 2761 ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat
 2821 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc
 2881 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca
 2941 catttccccg aaaagtgcc a c

pGEM-T Easy



Número de acceso en base de datos: No se encuentra en bases de datos. Las secuencias están disponibles en el sitio web del fabricante: http://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-easy-vector-systems/

Publicado en: Plásmido comercial sujeto a patente, propiedad de Promega Corporation.

Resistencia a antibióticos: Ampicilina.

Origen de replicación: ori

Secuencia:

El plásmido pGEM-T Easy se encuentra linearizado con la enzima EcoRV (secuencia subrayada) en el nucleótido número 60 de la secuencia presentada, con la adición de una timidina en los extremos 3' generados. Dicha timidina no se incluye en la secuencia.

```

1  GGGCGAATTG  GGCCCGACGT  CGCATGCTCC  CGGCCGCCAT  GGCGGCCGCG
51  GGAATTCGAT  ATCACTAGTG  AATTCGCGGC  CGCCTGCAGG  TCGACCATAT
101 GGGAGAGCTC  CCAACGCGTT  GGATGCATAG  CTTGAGTATT  CTATAGTGTC
151 ACCTAAATAG  CTTGGCGTAA  TCATGGTCAT  AGCTGTTTCC  TGTGTGAAAT
201 TGTATCCGC  TCACAATTCC  ACACAACATA  CGAGCCGGAA  GCATAAAGTG
251 TAAAGCCTGG  GGTGCCTAAT  GAGTGAGCTA  ACTCACATTA  ATTGCGTTGC
301 GCTCACTGCC  CGCTTCCAG  TCGGAAAACC  TGTCGTGCCA  GCTGCATTAA
351 TGAATCGGCC  AACCGCGGG  GAGAGGCGGT  TTGCGTATTG  GGCGCTCTTC
401 CGCTTCTCG  CTCCTGACT  CGCTGCGCTC  GGTTCGTTCG  CTGCGGCGAG
451 CGGTATCAGC  TCACTCAAAG  GCGTAATAC  GGTATCCAC  AGAATCAGGG
501 GATAACGCAG  GAAAGAACAT  GTGAGCAAAA  GGCCAGCAAA  AGGCCAGGAA
551 CCGTAAAAAG  GCCGCGTTGC  TGGCGTTTTT  CCATAGGCTC  CGCCCCCTG
601 ACGAGCATCA  CAAAAATCGA  CGCTCAAGTC  AGAGGTGGCG  AAACCCGACA
651 GGACTATAAA  GATACCAGGC  GTTCCCCCT  GGAAGCTCCC  TCGTGCCTC
701 TCCTGTTCCG  ACCCTGCCGC  TTACCGGATA  CCTGTCCGCC  TTTCTCCCTT
751 CGGAAGCGT  GGCCTTTCT  CATAGCTCAC  GCTGTAGGTA  TCTCAGTTCC
801 GTTAGGTCG  TTCGCTCAA  GCTGGGCTGT  GTGCACGAAC  CCCCCGTTCA
851 GCCCGACCGC  TGCCTTTAT  CCGTAACATA  TCGTCTTGAG  TCCAACCCGG

```


901 TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
 951 AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA
 1001 CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC
 1051 CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
 1101 ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG
 1151 AAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG
 1201 CTCAGTGAA CGAAAACCTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA
 1251 AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC
 1301 AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA
 1351 TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTTCGTT ATCCATAGTT
 1401 GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC
 1451 TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG
 1501 ATTTATCAGC AATAAACCCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT
 1551 CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC
 1601 TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG
 1651 CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTACAGC
 1701 TCCGGTTCCTT CCGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTGTGCAA
 1751 AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCTCCGAT CGTTGTGAGA AGTAAGTTGG
 1801 CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT
 1851 GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA
 1901 GTCATTCTGA GAATAGTGTA TCGGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT
 1951 CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACCTTAAA AGTGCTCATC
 2001 ATTGAAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACCTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT
 2051 GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT
 2101 CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT
 2151 GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GCGCACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT
 2201 CTTCTTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA
 2251 GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG
 2301 CGCACATTTT CCCGAAAAGT GCCACCTGAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA
 2351 GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGA AATTGTAAGC GTTAATATTT
 2401 TGTAAAAATT CGCGTTAAAT TTTTGTAAA TCAGTTCATT TTTTAACCAA
 2451 TAGGCCGAAA TCGGCAAAAT CCCTTATAAA TCAAAAAGAA AGACCGAGAT
 2501 AGGGTTGAGT GTTGTTCAG TTTGGAACAA GAGTCCACTA TTAAAGAACG
 2551 TGGACTCCAA CGTCAAAGGG CGAAAAACCG TCTATCAGGG CGATGGCCCA
 2601 CTACGTGAAC CATCACCCCTA ATCAAGTTTT TTGGGGTCGA GGTGCCGTAA
 2651 AGCACTAAAT CGGAACCCTA AAGGGAGCCC CCGATTTAGA GCTTGACGGG
 2701 GAAAGCCGGC GAACGTGGCG AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG
 2751 GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG TGTAGCGGTC ACGCTGCGCG TAACCACCAC
 2801 ACCCGCCGCG CTTAATGCGC CGCTACAGGG CGCGTCCATT CGCCATTACG
 2851 GCTGCGCAAC TGTGGGAAG GCGGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC
 2901 GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA TGTGCTGCAA GCGGATTAAG TTGGGTAACG
 2951 CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA ACGACGGCCA GTGAATTGTA
 3001 ATACGACTCA CTATA

ANEXO III

Número de acceso de secuencias utilizadas para alineamiento.

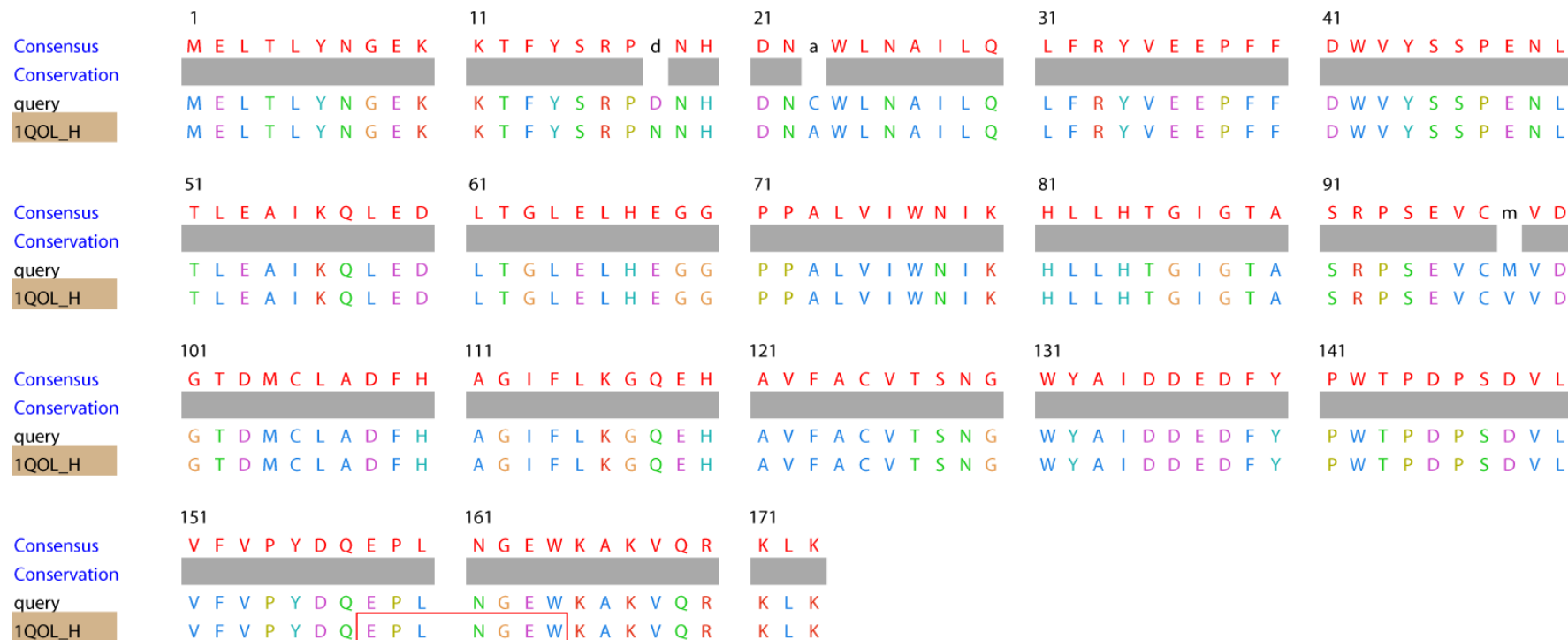
Números de acceso de las secuencias proteicas utilizadas para el análisis de pK-VFA/O1/Cam					
AAA53370 *	AAT01734	AAZ83660 *	ABU63087	ADM16566	AEE65046
AAB81991	AAT01735	AAZ83661 *	ABU63089	ADM16567	AEE65047
AAF09193	AAT01736	AAZ83662 *	ABU63090	ADM16568	AEE65048
AAM91949	AAT01737	AAZ83663 *	ABU63091	ADM16569	AEE65049
AAP79123	AAT01739	AAZ83664 *	ABU63093	ADM16570	AEE65050
AAP79124	AAT01740	AAZ83669 *	ABU63095	ADM36034	AEE65051
AAQ11227	AAT01741	AAZ83678 *	ABU63096	ADM36035	AEE65052
AAQ55600	AAT01744	AAZ83683 *	ABU67557	ADM36036	AEO22161
AAQ90285	AAT01746	ABB69024	ABU87555	ADM36037	AEQ49430
AAQ93493	AAT01749	ABD64065	ABU87556	ADM36038	AEQ49431
AAT011738	AAT01750	ABD64066	ABV03521	ADM36039	AEQ49433
AAT011747	AAT01751	ABD64068	ABV03522	ADN28046	AF154271_1
AAT011748	AAT01752	ABD64069	ABV56058	ADQ00606 *	AF377945_1
AAT011767	AAT01753	ABD64070	ABX61080	ADQ00607 *	AF506822_1
AAT011771	AAT01754	ABD64071	ABY91241	ADQ00609 *	AF511039_1
AAT011777	AAT01756	ABD64072	ACC63448	ADQ00610 *	BAC06475
AAT011790	AAT01757	ABD64074	ACC63449	ADQ00611 *	CAA07472
AAT011791	AAT01758	ABD64075	ACC63450	ADQ00613 *	CAA07561
AAT01695	AAT01759	ABD64076	ACC63451	ADQ00616 *	CAB60265
AAT01696	AAT01760	ABD64077	ACC63453	ADQ00619 *	CAB60267
AAT01696	AAT01761	ABD64084	ACC63458	ADR51741	CAB62902
AAT01697	AAT01762	ABD67455	ACC63459	ADR51742	CAC86575
AAT01699	AAT01763	ABD67461	ACC63460	ADR51743	CAD62208
AAT01701	AAT01764	ABF00113	ACC63461	ADR51744	CAD62369
AAT01702	AAT01765	ABF00114	ACL52157	ADR51745	CAD62370
AAT01703	AAT01766	ABF74751	ACL52158	ADR51746	CAD62371
AAT01705	AAT01768	ABI93976	ACL52159	ADR66169	CAD62372
AAT01706	AAT01769	ABI93977	ACP44144	ADR66170	CAD62373
AAT01706	AAT01770	ABI93978	ACT68346	ADR83528	CAG23917
AAT01709	AAT01772	ABI93979	ACT68347	ADU05399	CAL64773
AAT01710	AAT01773	ABI93980	ACT68348	ADU15820	NP_658990
AAT01711	AAT01774	ABI93981	ACT68349	ADU56664	NP_859426
AAT01713	AAT01776	ABI93982	ACT68351	ADV52243	YP_003328989
AAT01714	AAT01778	ABI93983	ACX54401	ADV52244	YP_022777
AAT01715	AAT01780	ABI93984	ACX54402	ADV52245	YP_024314
AAT01716	AAT01782	ABI93985	ACX54403	ADV52246	YP_024315
AAT01717	AAT01783	ABI93986	ACX54404	ADV52247	
AAT01719	AAT01784	ABI93987	ACX54405	ADV52248	
AAT01720	AAT01785	ABI93988	ADB28902	ADV52249	
AAT01721	AAT01786	ABI93990	ADB92543	ADX97244	
AAT01722	AAT01787	ABI93991	ADC92544	ADX97245	
AAT01723	AAT01788	ABI93992	ADC92545	AEE65036	
AAT01724	AAT01789	ABI93993	ADC92547	AEE65037	
AAT01725	AAT01794	ABI93994	ADC92548	AEE65038	
AAT01726	AAT01795	ABI93995	ADH32283	AEE65039	
AAT01729	AAT01796	ABI93996	ADH32284	AEE65040	
AAT01730	AAT97073	ABM63320	ADH32285	AEE65041	
AAT01731	AAU00941	ABM66095	ADI24382	AEE65042	
AAT01732	AAU00942	ABM66096	ADI24380	AEE65043	
AAT01733	AAZ23807	ABR19839	ADI24381	AEE65045	

- Los números de acceso corresponden a los utilizados en: Protein Database del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).
- Los números de acceso que poseen un asterisco a su izquierda corresponden a secuencias proteicas que abarcan solo las proteínas estructurales, el resto corresponde a secuencias de la poliproteína completa.

ANEXO IV

Alineamiento de secuencias proteicas utilizadas para los modelados y resultados obtenidos del análisis con el programa QMEAN.

Alineamiento de las secuencias proteicas de L^{pro} de VFA O1/Kaufbeuren (1QOL) y pK-VFA/O1/Cam.



Parámetros obtenidos con el programa QMEAN (Benkert y cols. 2011) para la molécula de L ^{pro} modelada de pK-VFA/O1/Cam.	Scoring function term	Raw score	Z-score
	C_beta interaction energy	-547.50	2.81
	All-atom pairwise energy	-26587.68	1.45
	Solvation energy	-95.98	1.11
	Torsion angle energy	-192.20	0.10
	QMEAN4 score	0.827	0.83

Alineamiento de las secuencias proteicas de VP2 de VFA O1 BFS (1QQP) y pK-VFA/O1/Cam.

	1	11	21	31	41
Consensus	D K K T E E T T L L	E D R I L T T R N G	H T T S T T Q S S V	G V T Y G Y A T A E	D F V S G P N T S G
Conservation	████████████████	████████████████	████████████████	████████████████	████████████████
query	D K K T E E T T L L	E D R I L T T R N G	H T T S T T Q S S V	G V T Y G Y A T A E	D F V S G P N T S G
1QQP_2	D K K T E E T T L L	E D R I L T T R N G	H T T S T T Q S S V	G V T Y G Y A T A E	D F V S G P N T S G
	51	61	71	81	91
Consensus	L E T R V V Q A E R	F F K T H L F D W V	T S D S F G R C H L	L E L P T D H K G V	Y G S L T D S Y A Y
Conservation	████████████████	████████████████	████████████████	████████████████	████████████████
query	L E T R V V Q A E R	F F K T H L F D W V	T S D S F G R C H L	L E L P T D H K G V	Y G S L T D S Y A Y
1QQP_2	L E T R V V Q A E R	F F K T H L F D W V	T S D S F G R C H L	L E L P T D H K G V	Y G S L T D S Y A Y
	101	111	121	131	141
Consensus	M R N G W D V E V T	a V G N Q F N G G C	L L V A M V P E L c	S I Q K R E L Y Q L	T L F P H Q F I N P
Conservation	████████████████	████████████████	████████████████	████████████████	████████████████
query	M R N G W D V E V T	T V G N Q F N G G C	L L V A M V P E L R	S I Q K R E L Y Q L	T L F P H Q F I N P
1QQP_2	M R N G W D V E V T	A V G N Q F N G G C	L L V A M V P E L c	S I Q K R E L Y Q L	T L F P H Q F I N P
	151	161	171	181	191
Consensus	R T N M T A H I T V	P F V G V N R Y D Q	Y K V H K P W T L V	V M V V A P L T V N	T E G A P Q I K V Y
Conservation	████████████████	████████████████	████████████████	████████████████	████████████████
query	R T N M T A H I T V	P F V G V N R Y D Q	Y K V H K P W T L V	V M V V A P L T V N	T E G A P Q I K V Y
1QQP_2	R T N M T A H I T V	P F V G V N R Y D Q	Y K V H K P W T L V	V M V V A P L T V N	T E G A P Q I K V Y
	201	211			
Consensus	A N I A P T N V H V	A G E F P S K E			
Conservation	████████████████	████████████████			
query	A N I A P T N V H V	A G E F P S K E			
1QQP_2	A N I A P T N V H V	A G E F P S K E			

Parámetros obtenidos con el programa QMEAN (Benkert y cols. 2011) para la molécula de VP2 modelada de pK-VFA/O1/Cam.	Scoring function term	Raw score	Z-score
	C_beta interaction energy	-86.46	-0.59
	All-atom pairwise energy	-5035.65	-0.88
	Solvation energy	-9.67	-1.56
	Torsion angle energy	-59.40	-0.13
	QMEAN4 score	0.717	-1.03

Alineamiento de las secuencias proteicas de 3D de VFA C-S8c1 (2EC0) y pK-VFA/O1/Cam.

	1	11	21	31	41
Consensus	G L I V D T R D V E	E R V H V M R K T K	L A P T V A H G V F	N P E F G P A A L S	N K D P R L N E G V
Conservation	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
query	G L I V D T R D V E	E R V H V M R K T K	L A P T V A H G V F	N P E F G P A A L S	N K D P R L N E G V
2EC0_D	G L I V D T R D V E	E R V H V M R K T K	L A P T V A H G V F	N P E F G P A A L S	N K D P R L N E G V
	51	61	71	81	91
Consensus	V L D E V I F S K H	K G D T K M S a E D	K A L F R R C A A D	Y A S R p H S V L G	T A N A P L S I Y E
Conservation	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
query	V L D E V I F S K H	K G D T K M S E E D	K A L F R R C A A D	Y A S R P H S V L G	T A N A P L S I Y E
2EC0_D	V L D E V I F S K H	K G D T K M S a E D	K A L F R R C A A D	Y A S R I H S V L G	T A N A P L S I Y E
	101	111	121	131	141
Consensus	A I K G V D G L D A	M E P D T A P G L P	W A L Q G K R R G A	L I D F E N G T V G	P E V E A A L K L M
Conservation	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
query	A I K G V D G L D A	M E P D T A P G L P	W A L Q G K R R G A	L I D F E N G T V G	P E V E A A L K L M
2EC0_D	A I K G V D G L D A	M E P D T A P G L P	W A L Q G K R R G A	L I D F E N G T V G	P E V E A A L K L M
	151	161	171	181	191
Consensus	E K R E Y K F A C Q	T F L K D E I R P M	E K V R A G K T R I	V D V L P V E H I L	Y T R M M I G R F C
Conservation	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
query	E K R E Y K F A C Q	T F L K D E I R P M	E K V R A G K T R I	V D V L P V E H I L	Y T R M M I G R F C
2EC0_D	E K R E Y K F A C Q	T F L K D E I R P M	E K V R A G K T R I	V D V L P V E H I L	Y T R M M I G R F C
	201	211	221	231	241
Consensus	A Q M H S N N G P Q	I G S A V G C N P D	V D W Q R F G T H F	A Q Y R N V W D V D	Y S A F D A N H C S
Conservation	██████████	██████████	██████████	██████████	██████████
query	A Q M H S N N G P Q	I G S A V G C N P D	V D W Q R F G T H F	A Q Y R N V W D V D	Y S A F D A N H C S
2EC0_D	A Q M H S N N G P Q	I G S A V G C N P D	V D W Q R F G T H F	A Q Y R N V W D V D	Y S A F D A N H C S

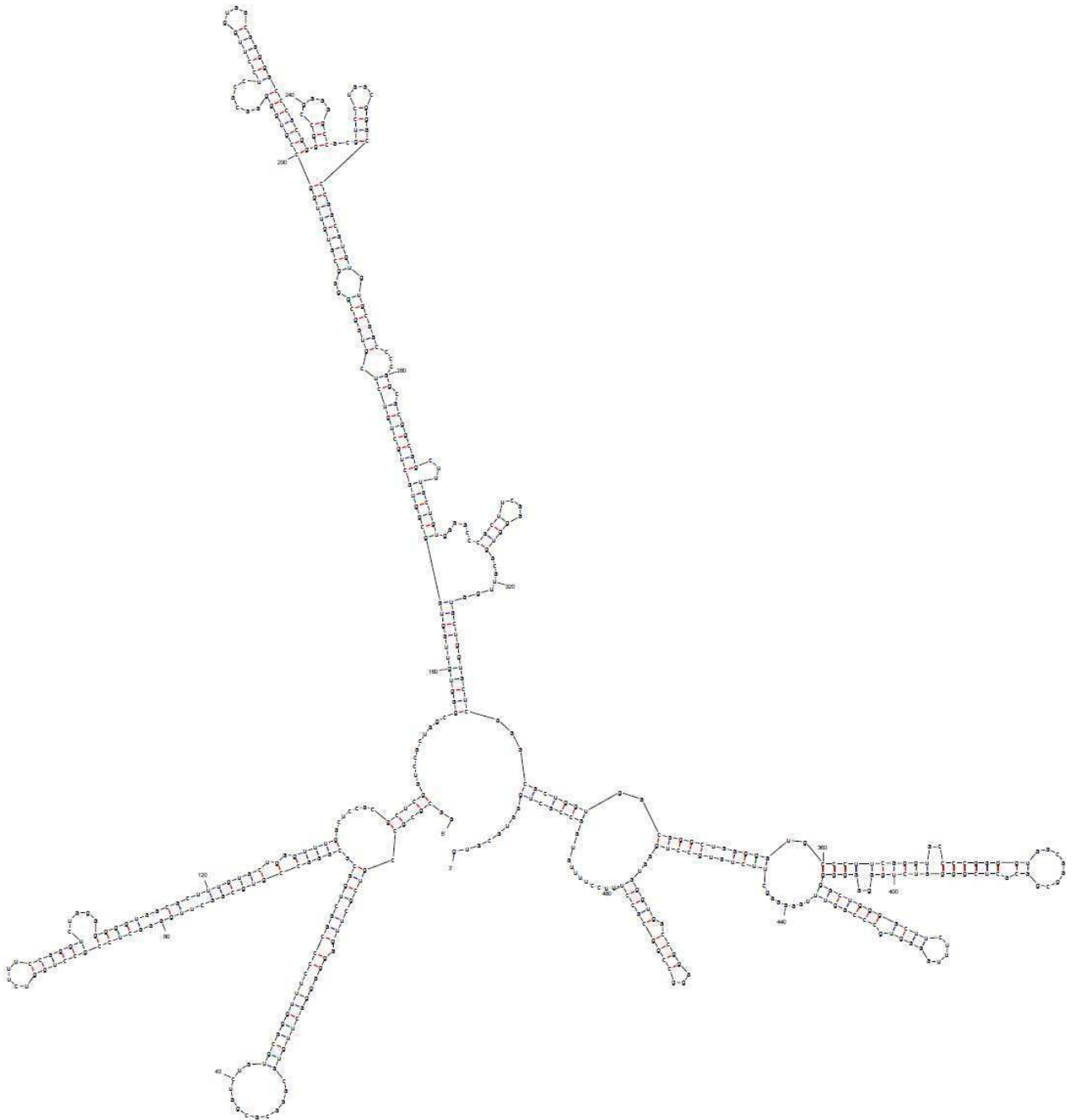
Parámetros obtenidos con el programa QMEAN (Benkert y cols. 2011) para la molécula de 3D modelada de pK-VFA/O1/Cam.	Scoring function term	Raw score	Z-score
	C_beta interaction energy	-176.48	0.13
	All-atom pairwise energy	-13435.33	0.38
	Solvation energy	-44.20	-0.00
	Torsion angle energy	-101.83	-1.12
	QMEAN4 score	0.715	-0.79

ANEXO V

Estructura secundaria de la región del IRES.

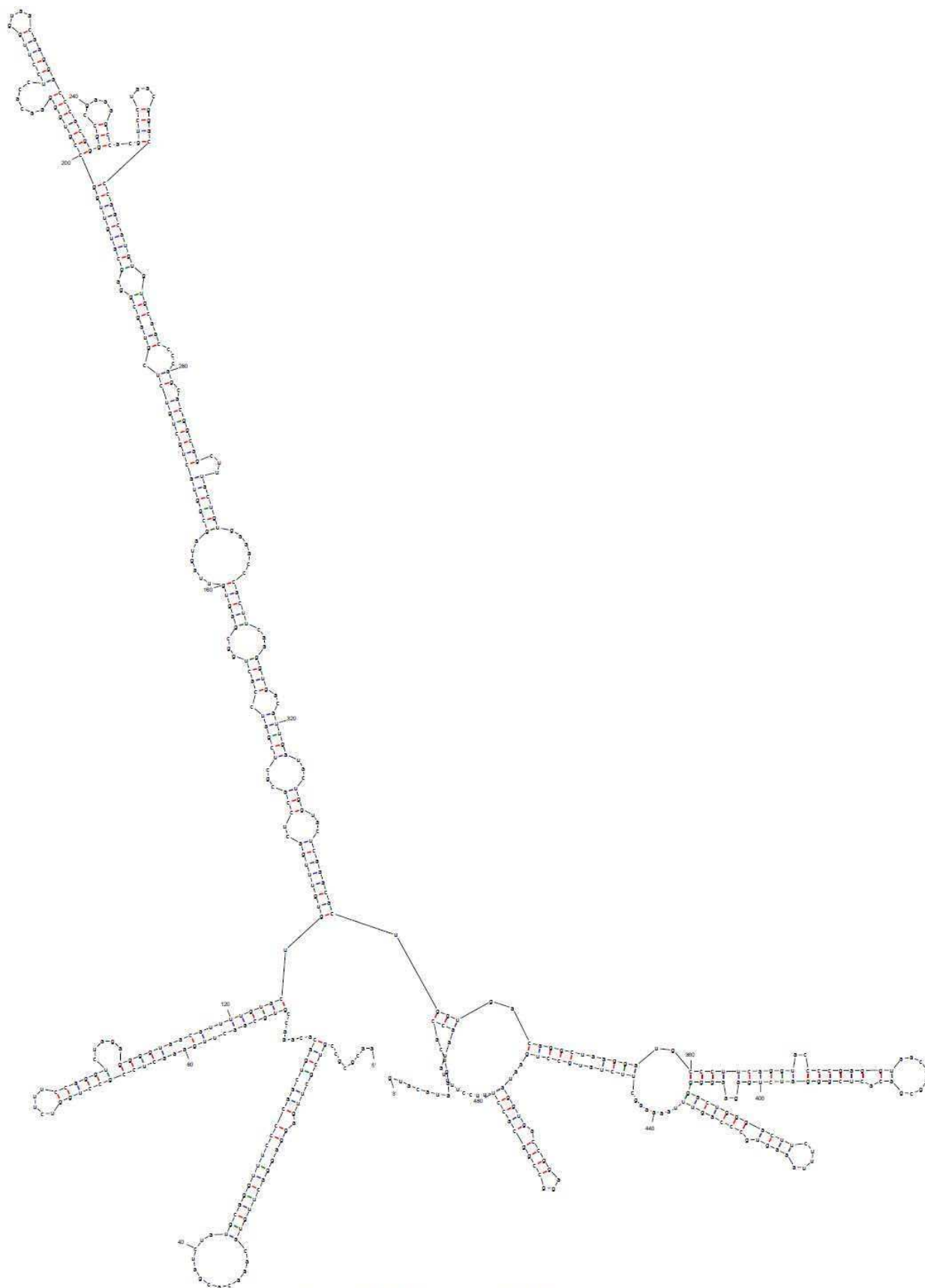
Estructura secundaria del IRES del VFA O1/Campos.

dG= -174.96



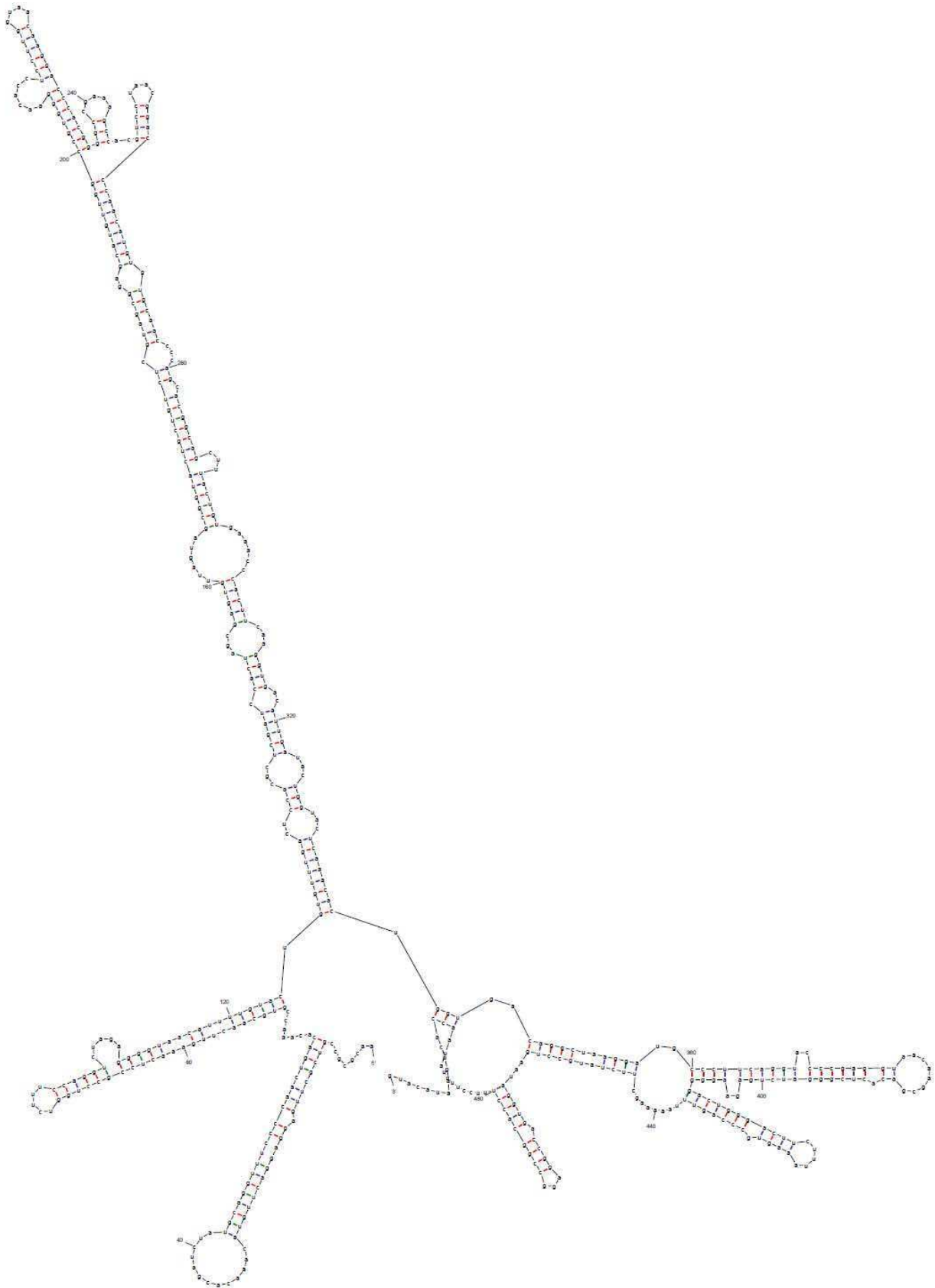
Estructura secundaria del IRES de pK-VFA/O1/Cam.

dG= -183.86



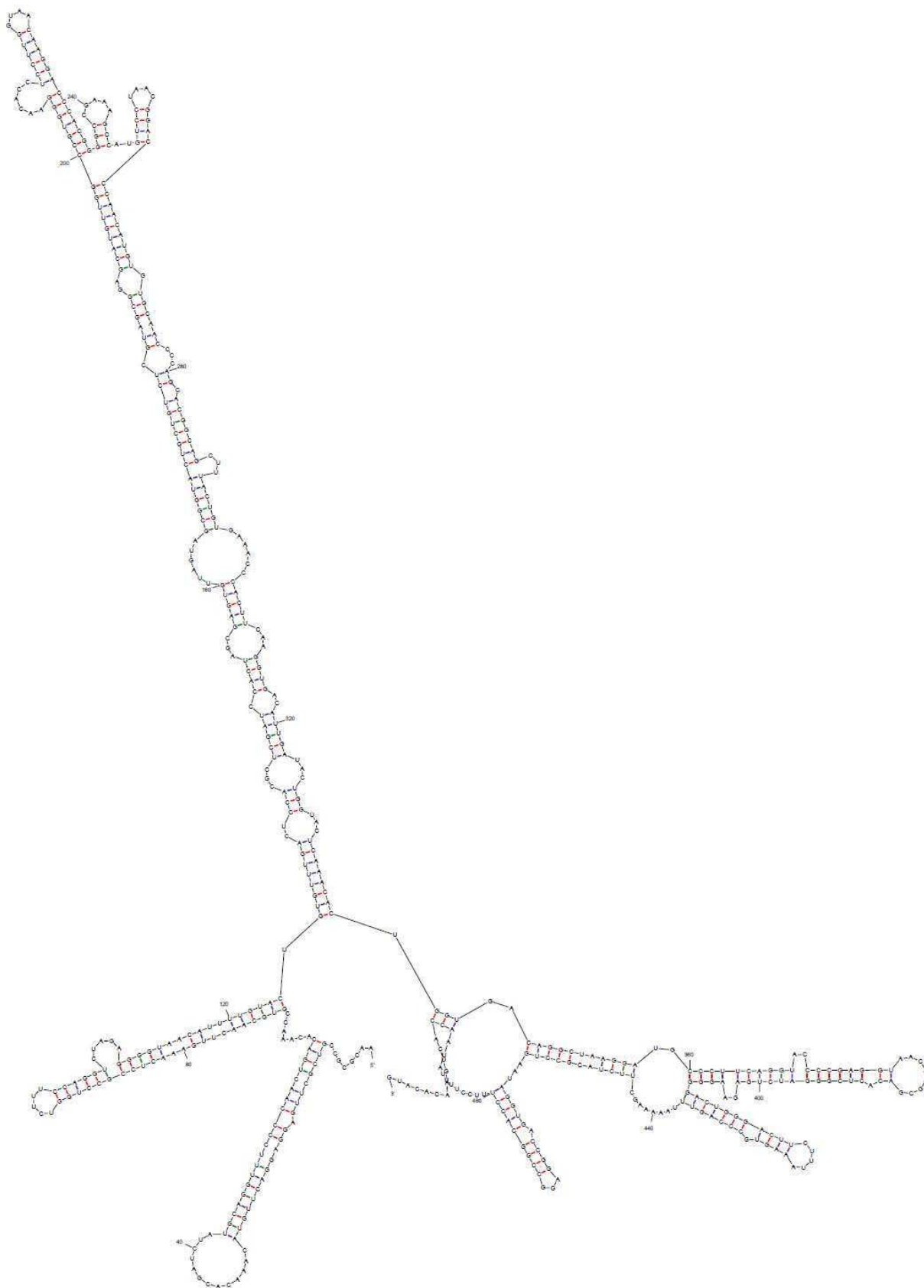
Estructura secundaria del IRES del VFA O1/Campos.
(con las sustituciones C696T y A706T)

dG= -182.76



Estructura secundaria del IRES del VFA O1/Kaufbeuren.

dG= -182.26



7. BIBLIOGRAFIA

- Abelson, P.H., 1982, Foot-and-mouth disease vaccines. *Science* 218, 1181.
- Abrams, C.C., King, A.M., Belsham, G.J., 1995, Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J Gen Virol* 76 (Pt 12), 3089-3098.
- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., 1989, The threedimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* 337, 709-716.
- Alexandersen, S., and A. I. Donaldson. 2002. Further studies to quantify the dose of natural aerosols of foot-and-mouth disease virus for pigs. *Epidemiol Infect* 128:313-23.
- Almeida M R, Rieder E, Chinsangaram J, Ward G, Beard C, Grubman M J and Mason P W 1998 Construction and evaluation of an attenuated vaccine for foot-and-mouth disease: difficulty adapting the leader proteinase-deleted strategy to the serotype O1 virus; *Virus Res.* 55 49–60
- Amador, A. 2004. Dinámica estocástica de la epidemia de Fiebre Aftosa. Tesis para optar por el grado de Doctor en Física. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Ambros, V., Baltimore, D., 1978 Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. *J Biol Chem* 253, 5263-5266.
- Ambros, V., Pettersson, R.F., Baltimore, D., 1978b, An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell* 15, 1439-1446.
- Anderer, F.A., Schlumberger, H.D., 1965, Properties of Different Artificial Antigens Immunologically Related to Tobacco Mosaic Virus. *Biochim Biophys Acta* 97,503-509.
- Angell SM, Baulcombe DC. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J.* 1997;16(12):3675-84.
- Argos, P., Kamer, G., Nicklin, M.J. y Wimmer, E. (1984). Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picornaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. *Nucleic Acids Res* 12, 7251-67
- Arnold, E., Luo, M., Vriend, G., Rossmann, M.G., Palmenberg, A.C., Parks, G.D., Nicklin, M.J., Wimmer, E., 1987, Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 21-25.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22,195-201.
- Astua-Monge G, Lyznik A, Jones V, Mackenzie SA, Vallejos CE. 2002. Evidence for a prokaryotic insertion-sequence contamination in eukaryotic sequences registered in different databases. *Theor Appl Genet.* 104(1):48-53.
- Augé de Melo P, 1982. The use of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine in endemic areas. *Bol Cent Panam Fiebre Aftosa* 1982;45:33-42.
- Augé de Mello, P., Honigman, M.N., Fernández, M.V., and Gomes, I. (1970). Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 73, 489-505.

- Augé de Melo P, Astudillo V, Gomes I, Campos Garcia JT. Immune response of adult cattle vaccinated with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. *Bol Cent Panam Fiebre Aftosa* 1977;26:27-9.
- Bachrach HL. Foot-and-mouth disease. *Annu Rev Microbiol* 1968;22:201-44.
- Bachrach, H.L. (1977). Foot-and-mouth disease virus. Properties, molecular biology and immunogenicity. En Romberger, J.A. (ed.), pp 3-31. Allanheld, Osmun Co. Montclair.
- Bachrach H L, Moore D M, McKercher P D & Polatnick ., 1975, Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J. Immunology* 115:1636-41.
- Bahnemann, H.G., 1975, Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol* 47, 47-56.
- Bahnemann, H.G. 1990. Inactivation of viral antigen for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine* 8:299
- Barnett P.V., Samuel A.R., Pullen L., Ansell D., Butcher R.N. & Parkhouse R.M.E. (1998). - Monoclonal antibodies against O1 serotype foot-and-mouth disease virus, from a natural bovine host, recognize similar antigenic features to those defined by the mouse. *J. gen. Virol*, 79, 1687-1697.
- Banerjee, R., W. Tsai, W. Kim, y A. Dasgupta. 2001. Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3' terminus negative strand cloverleaf requires an intact stem-loop b. *Virology* 280:41-51.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Lim, F., Domingo, E., 2001. Foot-and-mouth disease virus lacking the VP1 G-H loop: the mutant spectrum uncovers interactions among antigenic sites for fitness gain. *Virology* 288, 192-202.
- Baranowski, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Pariente, N., Verdaguer, N. & Domingo, E. (2003). Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv. Virus Res.* 62, 19-111
- Baranowski, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E. & Domingo, E. (2000). Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J. Virol.* 74, 1641-7.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Beck, E. y Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**, 6362-72
- Barco, A., y L. Carrasco. 1995. A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 14:3349-64.
- Barros, J. J., V. Malirat, M. A. Rebello, E. V. Costa, and I. E. Bergmann. 2007. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus isolates recovered from persistently infected water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet. Microbiol.* 120:50-62
- Barteling, S. J. 2004. Modern inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.
- Barteling, S.J., Woortmeyer, R., 1987, Multiple variants in foot-and-mouth disease virus (FMDV) populations: the Achilles heel for peptide and rec. DNA vaccines? *Dev Biol Stand* 66, 511-521.

- Barton DJ, Black EP, Flanagan JB (1995). Complete replication of poliovirus in vitro: Pre-initiation RNA replication complexes require soluble cellular factors for the synthesis of VPg-linked RNA. *J.Virol.*, 69: 5516-5527.
- Barton, D. J., O'Donnell, B. J. & Flanagan, J. B. (2001). 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cisacting replication element required for negative-strand synthesis. *Embo J* 20, 1439-48.
- Baxt, B. (1987). Effect of lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. *Virus Res* 7, 257-71
- Baxt, B., Bachrach, H.L., 1980. Early interactions of foot-and-mouth disease virus with cultured cells. *Virology* 104, 42/55.
- Baxt, B., Becker, Y., 1990. The effect of peptides containing the arginine/glycine/aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus Genes* 4, 73/83.
- Baxt, B. & Rieder, E. (2004). Molecular aspects of foot-and-mouth disease virus virulence and host range: Role of host cell receptors and viral factors. In *Foot-and-Mouth Disease. Current Perspectives*, pp. 145-172. Edited by F. Sobrino & E. Domingo. Wymondham: Horizon Bioscience.
- Bayry J, Prabhudas K, Gopalakrishna S, Patil PK, Ramakrishna C, Misra LD, Suryanarayana VV. 1999. Protective immune response to 16 kDa immunoreactive recombinant protein encoding the C-terminal VP1 portion of Foot and Mouth Disease Virus type Asia 1. *Microbiol Immunol.*43(8):765-71.
- Bazan, J.F. y Fletterick, R.J. (1988). Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7872-6
- Beard CW, Mason PW. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* 2000;74(2):987-91.
- Beck, E., Forss, S., Strebel, K., Cattaneo, R., Feil, G., 1983, Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucleic Acids Res.*; 11(22): 7873-7885.
- Becker, Y., 1994, Need for cellular and humoral immune responses in bovines to ensure protection from foot-and-mouth disease virus (FMDV)--a point of view. *Virus Genes* 8, 199-214.
- Belsham, G.J., 1992, Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *EMBO J* 11, 1105-1110.
- Belsham GJ. 2013. Influence of the Leader protein coding region of foot-and-mouth disease virus on virus replication. *J Gen Virol.* 94(Pt 7):1486-95.
- Belsham, G.J., 2005, Translation and Replication of FMDV RNA. In *Current Topics on Microbiology and Immunology* Volume 288, pp 43-70
- Belsham, G.J. and Bostock, C.J. 1988. Studies on the infectivity of foot-and-mouth disease virus RNA using microinjection. *J. Gen. Virol.* 69:265-274
- Belsham, G.J., Brangwyn, J.K., 1990, A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *J Virol.*; 64(11): 5389-5395
- Belsham, G.J. y Martinez-Salas, E. (2004). Genome organisation, translation and replication of foot-and-mouth disease viral RNA. En: Sobrino, F. y Domingo, E. (eds.). *Foot and mouth disease. Current perspectives*. pp 19-52. Horizon Bioscience, Norfolk

- Belsham, G.J. y Sonenberg, N. (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev* 60, 499-511
- Belsham, G. J., McInerney, G. M. & Ross-Smith, N. (2000). Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol* 74, 272-80.
- Belsham, G. J., Abrams, C. C., King, A. M., Roosien, J., y Vlak, J. M. (1991). Myristoylation of foot-and-mouth disease virus capsid protein precursors is independent of other viral proteins and occurs in both mammalian and insect cells. *J Gen Virol* 72 (Pt 3), 747-51.
- Benkert Pascal, Biasini Marco and Schwede Torsten. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 27, 343–350.
- Bergmann IE, Malirat V, Falczuk AJ. Evolving perception on the benefits of vaccination as foot-and-mouth disease control policy: contributions of South America. *Expert Rev Vaccines* 2005;4(6):903-13.
- Bergmann IE, Malirat V, Neitzert E. Non-capsid proteins to identify foot-and-mouth disease viral circulation in cattle irrespective of vaccination. *Biologicals* 2005;33:235-9.
- Berryman, S., Clark, S., Monaghan, P., Jackson, T., 2005, Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 79, 8519-8534.
- Bienz, K., Egger, D., and Pasamontes, L. 1987. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160:220–226
- Bienz, K., Egger, D., Pfister, T., Troxler, M., 1992, Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol* 66, 2740-2747.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M. and Pasamontes, L. 1990. Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J. Virol.* 64:1156–1163
- Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J., Brown, F., 1982, Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298, 30-33.
- Blyn, L.B., Towner, J.S., Semler, B.L., Ehrenfeld E., 1997, Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J Virol.* 71(8): 6243–6246.
- Bolten, R., Egger, D., Gosert, R., Schaub, G., Landmann, L., Bienz, K, 1998, Intracellular Localization of Poliovirus Plus- and Minus-Strand RNA Visualized by Strand-Specific Fluorescent In Situ Hybridization. *J Virol.*; 72(11): 8578–8585
- Boothroyd, J. C., Harris, T. J. R., Rowlands, D. J. & Lowe, P. A. (1982). The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Gene* 17, 153–161.
- Boyer JC, Haenni AL. (1993). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virol.*, 198: 415-426.
- Boyer J C and Haenni A L 2002 Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses; *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 25 297–308
- Brocchi E, Bergmann IE, Dekker A, Paton DJ, Sammin DJ, Greiner M, Grazioli S, De Simone F, Yadin H, Haas B, Bulut N, Malirat V, Neitzert E, Goris N, Parida S, Sørensen K, De Clercq K.

- Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 2006;24:6966-79.
- Broekhuijsen, M.P., Blom, T., Kottenhagen, M., Pouwels, P.H., Meloen, R.H., Barteling, S.J., Enger-Valk, B.E., 1986, Synthesis of fusion proteins containing antigenic determinants of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 4, 119-124.
- Brooksby JB. Portraits of viruses: Foot-and-mouth disease virus. *Intervirology* 1982;18:1-23.
- Brown, F. (1972). Structure-function relationships in foot-and-mouth disease virus. *Adv Exp Med Biol* 31(0), 19-28.
- Brown, F., Graves, J.H., 1959, Changes in specificity and electrophoretic mobility of the precipitating antibodies present in the serum of cattle recovering from foot-and-mouth disease. *Nature* 183, 1688-1689.
- Brown, J.K., S.M. McAleese, E.M. Thornton, J.A. Pate, A. Schock, A.I. Macrae, P.R. Scott, H.R. Miller, and D.D. Collie, 2006: Integrin-alpha5beta1, a putative receptor for foot-and-mouth disease virus, is constitutively expressed in ruminant airways. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 807-816.
- Burman A, Clark S, Abrescia NG, Fry EE, Stuart DI, Jackson T. 2006, Specificity of the VP1 GH loop of Foot-and-Mouth Disease virus for alpha5 integrins. *J Virol.*;80(19):9798-810.
- Burness, A.T., Pardoe, I.U., Fox, S.M., 1973, Evidence for the lack of glycoprotein in the encephalomyocarditis virus particle. *J Gen Virol* 18, 33-49.
- Burrows, R., 1968, The persistence of foot-and mouth disease virus in sheep. *J Hyg (Lond)* 66, 633-640.
- Cao, X., Bergmann, I.E., Füllkrug, R., Beck, E., 1995, Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *J Virol.*; 69(1): 560-563
- Carrillo, E.C., Giachetti, C. y Campos, R.H. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth disease virus replication. *Virology*. 135, 542-5
- Carrillo, E. C., E. Rieder Rojas, L. Cavallaro, M. Schiappacassi, and R. Campos. 1989. Modifications of foot-and-mouth disease virus after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *Virology* 171:599-601.
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F., y Rock, D. L. (2005). Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 79(10), 6487-504.
- Carroll, A., R., Rowlands, D. J., Clarke, B., E., 1984, The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.*; 12(5): 2461-2472.
- Cartwright B, Chapman WG, Sharpe RT. Stimulation of heterotypic antigens of foot-and-mouth disease virus antibodies in vaccinated cattle. *Res Vet Sci* 1982;32:338-42.
- Casas Olascoaga, R.C. (Ed); Gomes, I.; Rosemberg, F.; Augé de Mello, P.; Astudillo, V.; Magallanes, N. 1999. Fiebre aftosa. Atheneu Ed. São Paulo, Brasil.
- Chapman S, Hills G, Watts J, Baulcombe D. Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology*. 1992;191(1):223-30.
- Chang, Y., Zheng, H., Shang, Y., Jin, Y., Wang, G., Shen, X., and Liu X. (2009), Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from full-length genomic cDNA clones using an RNA polymerase I system. *Acta Biochim Biophys Sin* 998-1007

- Chatterjee NK, Bachrach HL, Polatnick J., 1976, Foot-and-mouth disease virus RNA. Presence of 3'-terminal polyriboadenylic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology*.69(2):369-77.
- Chinsangaram, J., Beard, C., Mason, P.W., Zellner, M.K., Ward, G., Grubman, M.J., 1998, Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J Virol* 72, 4454-4457.
- Chow, M., J. F. Newman, D. Filman, J. M. Hogle, D. J. Rowlands, y F. Brown. 1987. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 327:482-6.
- Collen, T., 1994, Foot-and-mouth disease (Aphthovirus) : viral T cell epitopes. *Cell- Mediated Immunity in Ruminants*, 173-212.
- Collen, T., Doel, T.R., 1990, Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J Gen Virol* 71 (Pt 2), 309-315. Cooper, P.D., 1978, Picornaviridae: Second report. *Intervirology*. 10, 165-180.
- Collen, T., R. Dimarchi, and T. R. Doel. 1991. A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *J Immunol* 146:749-55.
- Correa Melo, E., Saraiva, V. y Astudillo, V. (2002). Review of the status of foot and mouth disease in countries of South America and approaches to control and eradication. *Rev. Sci. Tech.* 21, 429-36
- Costa Giomi MP, Bergmann IE, Scodeller EA, Augé de Mello P, Gomez I, La Torre JL. Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in aphthovirus: biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidylic acid tracts of different lengths. *J Virol* 1984;51:799-805.
- Cottam, E. M., Wadsworth, J., Shaw, A. E., Rowlands, R. J., Goatley, L., Maan, S., Maan, N. S., Mertens, P. P., Ebert, K., Li, Y., Ryan, E. D., Juleff, N., Ferris, N. P., Wilesmith, J. W., Haydon, D. T., King, D. P., Paton, D. J., y Knowles, N. J. (2008). Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathog* 4(4), e1000050.
- Cottral, G.E., Cox, B.F., Baldwin, D.E., 1960, The survival of foot-and-mouth disease virus in cured and uncured meat. *Am J Vet Res* 21, 288-297.
- Cottral, G.E., Gailiunas, P., Cox, B.F., 1968, Foot-and-mouth disease virus in semen of bulls and its transmission by artificial insemination. *Arch Gesamte Virusforsch* 23, 362-377.
- Cubillos, C., de la Torre, B.G., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Bárcena, J., Andreu, D., Sobrino, F., Blanco, E., 2008, Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *J Virol* 82(14):7223-30,
- Curry, S., Abrams, C.C., Fry, E., Crowther, J.C., Belsham, G.J., Stuart, D.I., King, A.M., 1995, Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol* 69, 430-438.
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J., Rowlands, D. y Stuart, D. (1996). Perturbations in the surface structure of A22 Iraq foot-and-mouth disease virus accompanying coupled changes in host cell specificity and antigenicity. *Structure* 4, 135-45
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J., Stuart, D., 1997, Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 71, 9743-9752.

- D'Antuono, A., Laimbacher, A.S., La Torre, J., Tribulatti, V., Romanutti, C., Zamorano, P., Quattrocchi, V., Schraner, E.M., Ackermann, M., Fraefel, C., Mattion, N., 2010, HSV-1 amplicon vectors that direct the in situ production of foot-and-mouth disease virus antigens in mammalian cells can be used for genetic immunization. *Vaccine* 28, 7363-7372.
- Dawe P.S., Sørensen K., Ferris N.P., Barnett I.T.R., Armstrong R.M. & Knowles N.J. (1994). – Experimental transmission of foot-and-mouth disease virus from carrier African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in Zimbabwe. *Vet. Rec.*, 134, 211-215.
- de Felipe, P., L. E. Hughes, M. D. Ryan, y J. D. Brown. 2003. Cotranslational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem* 278:11441-8.
- de Jong, A. S., de Mattia, F., Van Dommelen, M. M., Lanke, K., Melchers, W. J., Willems, P. H. & van Kuppeveld, F. J. (2008). Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *J Virol* 82, 3782-90.
- de la Torre, J. C., Davila, M., Sobrino, F., Ortín, J., y Domingo, E. (1985). Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology* 145(1), 24-35.
- de la Torre, J.C., Martínez-Salas, E., Díez, J., Villaverde, A., Gebauer, F., Rocha, E., Davila, M., Domingo, E., 1988, Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* 62, 2050-2058.
- de los Santos, T., S. de Avila Botton, R. Weiblen, and M. J. Grubman. 2006. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J. Virol.* 80, 1906-1914
- Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., Ehrenfeld, E., Grubman, M.J., 1988, Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the capsid protein complex. *J Virol* 62, 4407-4409.
- Dicara D, Burman A, Clark S, Berryman S, Howard MJ, Hart IR, Marshall JF, Jackson T: Foot-and-mouth disease virus forms a highly stable, EDTA-resistant complex with its principal receptor, integrin $\alpha\beta 6$: implications for infectiousness. *J Virol* 2008, 82(3):1537-1546.
- Dietzschold, B., Kaaden O., R., and Ahl, R., 1971, Hybridization Studies with Subtypes and Mutants of Foot-and-Mouth Disease Virus Type O, *J. Gen. Virol.* 13: 1-7
- Díez, J., Dávila, M., Escarmís, C., Mateu, M.G., Domínguez, J., Pérez, J.J., Giralt, E., Melero, J.A. y Domingo, E. (1990). Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth disease virus from a persistent infection in cell culture. *J Virol* 64, 5519-28
- Díez, J., M. G. Mateu, and E. Domingo. 1989. Selection of Antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *J. Gen.Virol.* 70:3281-3289.
- Doedens, J. R. & Kirkegaard, K. (1995). Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J* 14, 894-907.
- Doel, T.R., 2003, FMD vaccines. *Virus Res* 91, 81-99.
- Domingo, E. y Holland, J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51, 151-78
- Domingo, E., Dávila, M. y Ortín, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* 11, 333-46
- Domingo, E., Biebricher, C.K., Holland, J.J. y Eigen, M. (2001). *Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences*. Landes Bioscience, Austin.

- Domingo, E., Escarmís, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Núñez, J.I. y Sobrino, F. (2003). Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research* 91, 47-63
- Domingo, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J. y Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol.*; 299, 51-82.
- Domingo, E., Mateu, M.G., Martínez, M.A., Dopazo, J., Moya, A. y Sobrino, F. (1990). Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. En: Kurstak, E., Marusyk, R. G.,
- Domingo, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Arias, A., García-Arriaza, J. y Escarmís, C. (2004). Quasispecies dynamics and evolution of foot-and-mouth disease virus. En F. Sobrino y E. Domingo (Eds.), *Foot-and-mouth disease. Current perspectives*, pp. 261-304. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Donnelly, M. L., L. E. Hughes, G. Luke, H. Mendoza, E. ten Dam, D. Gani, y M. D. Ryan. 2001. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol* 82:1027-41.
- Dore JM, Erny C, Pinck L (1990). Biologically active transcripts of alfalfa mosaic virus RNA3. *FEBS Lett.*, 264: 183-186.
- Drzeniek, R., Bilello, P., 1974, Absence of glycoproteins in poliovirus particles. *J Gen Virol* 25, 125-132.
- Dunbrack R.L. and Karplus, M. 1993. Backbone-dependent rotamer library for proteins. Application to side-chain prediction. *J. Mol. Biol.* 230: 543-574.
- Dunn, C.S. y Donaldson, A.I. (1997). Natural adaptation to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth-disease virus. *Vet Rec* 141, 174-5.
- Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csörgo B, Pósfai G, Weinstock GM, Blattner FR. 2008. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol.* (7):2597-606.
- Eble, P. L., A. Bouma, K. Weerdmeester, J. A. Stegeman, and A. Dekker. 2007. Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine* 25:1043-54.
- Echeverri, A.C., Dasgupta, A., 1995, Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 208, 540-553.
- Ellard, F.M., Drew, J., Blakemore, W.E., Stuart, D.I., King, A.M., 1999, Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Gen Virol* 80 (Pt 8), 1911-1918.
- Escarmis, C., Carrillo, E.C., Ferrer, M., Arriaza, J.F., Lopez, N., Tami, C., Verdaguier, N., Domingo, E., Franze-Fernandez, M.T., 1998, Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *J Virol* 72, 10171-10179.
- Escarmís, C., Dopazo, J., Dávila, M., Palma, E.L. y Domingo, E. (1995). Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus Res* 35, 155-67
- Escarmís C, Lázaro E, Arias A, Domingo E. 2008. Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: implications for viral extinction. *J Mol Biol.*; 376(2):367-79.
- Escarmís, C., Toja, M., Medina, M., y Domingo, E. (1992). Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res* 26(2), 113-25.

- Evans, D., 1999, Reverse Genetics of Picornaviruses. *Adv in Vir Res* 53, 209-228
- Falk, M. M., F. Sobrino, y E. Beck. 1992. VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 66:2251-60.
- Falk, M.M., Grigera, P.R., Bergmann, I.E., Zibert, A., Multhaupt, G., Beck, E., 1990. Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J. Virol.* 64,748/756.
- Fauquet, C., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A., y (Eds.) (2005). "VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" 8th ed. Academic Press.
- Ferguson, N.M., Donnelly, C.A. y Anderson, R.M. (2001). The foot-and-mouth epidemic in Great Britain: pattern of spread and impact of interventions. *Science* 292, 1155-60
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E., y Verdaguier, N. (2006). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *Embo J* 25(4), 880-8.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E. y Verdaguier, N. (2004). Structure of foot and mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem* 279, 47212-21
- Ferrer-Orta Cristina, Arias Armando, Perez-Luque Rosa, Escarmis Cristina, Domingo Esteban, and Verdaguier Nuria. 2007 . Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication *PNAS* 104 (22). 9463–9468.
- Feyfant Eric, Sali Andrej, and Fiser Andrés. 2007. Modeling mutations in protein structures. *Protein Sci.* ; 16(9): 2030–2041.
- Filgueiras, P., 2000, Detection and characterization of functional T-cell epitopes on the structural proteins VP2, VP3, and VP4 of foot and mouth disease virus O1 Campos. *Virology* 5, 234-239.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. (2009). Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control, 3rd edn. Washington, D.C.: ASM Press.
- Francis, M.J., 1990, Peptide vaccines for viral diseases. *Sci Prog* 74, 115-130.
- Francis, M. J., and L. Black. 1983. Antibody response in pig nasal fluid and serum following foot-and-mouth disease infection or vaccination. *J. Hyg.* 91:329–334.
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E., Schaller, H., 1984, Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 12(16): 6587–6601.
- Fox, G., Parry, N.R., Barnett, P.V., McGinn, B., Rowlands, D.J. y Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine- aspartic acid). *J Gen Virol* 70, 625-37
- Fowler V L, Paton D J, Rieder E and Barnett P V 2008 Chimeric foot-and-mouth disease viruses: Evaluation of their efficacy as potential marker vaccines in cattle; *Vaccine* 7 1982–1989
- Freund, J., K. J. Thomson, H. B. Hough, H. E. Sommer, and T. M. Pisani. 1948. Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants. *J. Immunol.* 60:383-398
- Fry Elizabeth E, Lea Susan M, Jackson Terry, Newman John W, Ellard Fiona M, Blakemore Wendy E, Abu-Ghazaleh Robin, Samuel Alan, King and Stuart David I. (1999). The structure and function of a foot-and-mouth disease virus–oligosaccharide receptor complex. *EMBO J.* 18 (3). 543–554.

- García-Arriaza J, Manrubia SC, Toja M, Domingo E, Escarmís C. 2004. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol.*; 78(21):11678-85.
- García-Arriaza J, Ojosnegros S, Dávila M, Domingo E, Escarmís C. 2006. Dynamics of mutation and recombination in a replicating population of complementing, defective viral genomes. *J Mol Biol.*;360(3):558-72.
- García-Briones, M. M., E. Blanco, C. Chiva, D. Andreu, V. Ley, and F. Sobrino. 2004. Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and mouth disease virus polymerase 3D. *Virology* 322:264-75.
- Gamarnik, A.V., Andino, R., 1998, Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 12, 2293-2304.
- Gebauer, F., de la Torre, J.C., Gomes, I., Mateu, M.G., Barahona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., de Mello, P.A., Domingo, E., 1988, Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J Virol* 62, 2041-2049.
- Gerald M. McInerney, Andrew M. Q. King, Natalie Ross-Smith and Graham J. Belsham. Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences. *Journal of General Virology* (2000), 81, 1699–1702.
- Gerber, K., Wimmer, E. and Paul, A.V. 2001. Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2Apro. *J Virol.* 75:10979–10990
- Giachetti, C., Hwang, S.S., Semler, B.L., 1992, cis-acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a poliovirus membrane protein involved in RNA replication. *J Virol* 66, 6045-6057.
- Giraud A., Beck E., Strebel K., Mello P.A., La Torre J., Scodeller E., Bergmann I. Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology* 1990, 177: 780-783.
- Glass, E. J., R. A. Oliver, T. Collen, T. R. Doel, R. Dimarchi, and R. L. Spooner. 1991. MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunology* 74:594-9.
- Golini, F., Semler, B.L., Dorner, A.J., Wimmer, E., 1980, Protein-linked RNA of poliovirus is competent to form an initiation complex of translation in vitro. *Nature* 287, 600-603.
- Gopinath S. M., Joshi R.R., Singh S., Pradhan P. 2012. A strategy for the production of infective chimeric foot and mouth disease virus to develop vaccines for FMD. *The Experiment*, 5 (2), 277-286
- Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V. (1989). Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res* 17, 8413-40.
- Goris N, Maradei E, D Aloia RD, Fondevila N, Mattion N, Perez A, Smitsaart E, Nauwynck HJ, La Torre J, Palma E, De Clercq K. Foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle using homologous and heterologous challenge strains: Precision of the “Protection against Podal Generalisation” test. *Vaccine* 2008;26:3432-7
- Gritsun TS, Gould EA. Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. *J Virol Methods.* 1998;76(1-2):109-20.
- Gromeier, M., Wimmer, E. & Gorbalenya, A. E. (1999). Genetics, pathogenesis and evolution of picornaviruses. In *Origin and Evolution of Viruses*, pp. 287-343. Edited by E. Domingo, R. G. Webster & J. J. Holland. San Diego: Academic Press.
- Grubman, M.J., Baxt, B., 2004, Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* 17, 465-493.

- Grubman, M.J., Lewis, S.A., Morgan, D.O., 1993, Protection of swine against foot-and- mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* 11, 825-829.
- Grubman, M.J., Morgan, D.O., Kendall, J., Baxt, B., 1985. Capsid intermediates assembled in a foot-and-mouth disease virus genome RNA-programmed cell-free translation system and in infected cells. *J. Virol.* 56, 120-126.
- Grubman, M.J., Robertson, B.H., Morgan, D.O., Moore, D.M., Dowbenko, D., 1984. Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 50, 579/586.
- Guarne, A., Tormo, J., Kirchweger, R., Pfistermueller, D., Fita, I. and Skern, T. 1998. Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain-like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *EMBO J.* 17:7469–7479
- Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
- Harris, K.S., Xiang, W., Alexander, L., Lane, W.S., Paul, A.V., Wimmer, E., 1994, Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding. *J Biol Chem* 269, 27004-27014.
- Hashimoto-Gotoh T, Tsujimura A, Ogasahara Y. 1995. Detection of exonuclease activities in restriction endonuclease preparations using an enforcement plasmid for kanamycin-resistance selection. *Gene.* 164(1). 41-44.
- Heath, L., van der Walt, E., Varsani, A. & Martin, D. P. 2006 Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J Virol* 80, 11827-32.
- Heaton LA, Carrington JC, Morris TJ (1989). Turnip crinkle virus infection from RNA synthesized in vitro. *Virol.*, 170: 214-218.
- Hedger RS. Observations on the carrier state and related antibody titres during an outbreak of foot and mouth disease. *J. Hyg Camb* 1970;68:53-60.
- Herold, J. & Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* 7, 581-91.
- Herrera, M., Grande-Perez, A., Perales, C., Domingo, E., 2008, Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J Gen Virol* 89, 232-244.
- Higuchi R., Krummell B and R.K.Saiki. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research* 16 (15), 1988
- Hobson SD, Rosenblum ES, Richards OC, Richmond K, Kirkegaard K, Schultz SC. 2001. Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *EMBO J.* Mar 1;20(5):1153-63.
- Holland, J. J., McLaren, L. C., and Syverton, J. T. (1959). The mammalian cell-virus interaction: IV. Infection of naturally insusceptible cells with enterovirus ribonucleic acid. *J. Exp. Med.* 110, 65-80.
- Hogle, J.M., Chow, M., Filman, D.J., 1985, Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 229, 1358-1365.
- Hollister, J.R., Vagnozzi, A., Knowles, N.J., Rieder, E., 2008. Molecular and phylogenetic analyses of bovine rhinovirus type 2 shows it is closely related to foot-and-mouth disease virus. *Virology* 373 (2), 411–425.

- Huang, C.C., Jong, M.H., Lin, S.Y., 2000, Characteristics of foot and mouth disease virus in Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 62 (7), 677–679.
- Hughes, G. J., V. Mioulet, R. P. Kitching, M. E. Woolhouse, S. Alexandersen, y A. I. Donaldson. 2002. Foot-and-mouth disease virus infection of sheep: implications for diagnosis and control. *Vet Rec* 150:724- 7.
- Hyslop, N.S., 1965, Isolation of variant strains from foot-and-mouth disease virus propagated in cell cultures containing antiviral sera. *J Gen Microbiol* 41, 135-142.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990 Nov 30;96(1):23-8.
- Jackson, T., Clark, S., Berryman, S., Burman, A., Cambier, S., Mu, D., Nishimura, S., King, A.M., 2004, Integrin α 5 β 1 functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the beta-chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol* 78, 4533-4540.
- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W. & King, A. M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 70, 5282–5287.
- Jackson, T., Mould, A.P., Sheppard, D., King, A.M., 2002, Integrin α 5 β 1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 76, 935-941.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., King, A.M., 2000, The epithelial integrin α 5 β 1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 74, 4949-4956.
- Jang, S.K., Pestova, T.V., Hellen, C.U., Witherell, G.W. y Wimmer, E. (1990). Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme* 44, 292-309
- King AM, Sangar DV, Harris TJ, Brown F (1980) Heterogeneity of the genome-linked protein of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 34: 627–634.
- Kirchweger R., Ziegler E., Lamphear B. J., Waters D., Liebig H.D., Sommergruber W., Sobrino F., Hohenadl C., Blaas S D., Rhoads R. E. and Skern T. (1994) Foot-and-Mouth Disease Virus Leader Proteinase: Purification of the Lb Form and Determination of Its Cleavage Site on eIF-4 γ . *J Virol.* 68 (9). 5677-5684
- Kitching, R.P., 1998, A recent history of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol* 118, 89-108.
- Kleid D U, Yansura D, Small B. Dowbenko D, Moore D M, Grubman M 1. McKercher P D, Morgan D O., Robertson B H & Bachrach H C. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* 214:1125-9, 1981.
- Knipe, T., Rieder, E., Baxt, B., Ward, G., Mason, P.W., 1997, Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *J Virol* 71, 2851-2856.
- Knowles NJ, Samuel AR. Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus. *Virus research* 2003; 91:65-80
- Knox, C., Moffat, K., Ali, S., Ryan, M., Wileman, T., 2005, Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *J Gen Virol* 86, 687-696.
- König GA, Palma E, Maradei E, Piccone ME. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus types A and O isolated in Argentina during the 2000-2002 epizootic. *Vet Microbiol* 2007;124:1-15.

- Kuhn R, Hong Z, Strauss JH (1990). Mutagenesis in the nontranslated region of Sindbis virus RNA. *J. Virol.* 64: 1472-1476
- Kuhn, R., Luz, N. y Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 64, 4625-31
- La Torre, L., 1980, The structural polypeptides of aphthovirus are phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci.* 77, 7444-7447.
- Lai CJ, Zhao BT, Hori H, Bray M. 1991. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88(12):5139-43.
- Laporte, J., Grosclaude, J., Wantyghem, J., Bernard, S. & Rouze, P. (1973). Neutralisation en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fevre aphteuse par des serums provenant de porcs immunisés a l'aide d'une proteine virale purifiée. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, sbrrie D 276, 3399-3402.
- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., Stuart, D. y Mateu, M.G. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* 2, 123-39
- Lewis, S.A., Morgan, D.O., Grubman, M.J., 1991, Expression, processing, and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J Virol* 65, 6572-6580.
- Li, Z., Yi, Y., Yin, X., Zhang, Z., y Liu, J. (2008). Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PLoS ONE* 3(5), e2273.
- Li, F., Browning, G. F., Studdert, M. J. & Crabb, B. S. (1996). Equine rhinovirus 1 is more closely related to foot-and-mouth disease virus than to other picornaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93, 990-995.
- Liang Q, Chen L, Fulco AJ. An efficient and optimized PCR method with high fidelity for site-directed mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 1995 Apr;4(5):269-74.
- Liebermann, H.T., Thalmann, G., Bartels, T., Nockler, A., 1993, Experiments on an early protection against foot-and-mouth disease virus. *Acta Virol* 37, 181-183.
- Lindberg, A. M., Polacek, C., and Johansson, S. (1997). Amplification and cloning of complete enterovirus genomes by long distance PCR. *J. Virol. Methods* 65, 191-199.
- Liu GQ, Liu ZX, Zhang XS, Chang HY, Guo HC, Li D and Liu XT. The complete genomic sequence of a foot-and-mouth disease virus isolated from the swine. *Agriculture Sci China* 2004, 3: 395-400.
- Liu, Y., Wimmer, E., Paul, A.V., 2009, Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochim Biophys Acta.*; 1789(9-10): 495-517
- Loeffler, F; Frosch, P. *Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.* *Zbl. Bakt. I/Orig* 1897; 22: 257-259, 1898; 23: 371-391.
- Lyle, J. M., E. Bullitt, K. Bienz, y K. Kirkegaard. 2002. Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* 296:2218-22.
- Luz, N., Beck, E., 1990. A cellular 57 kDa protein binds to two regions of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *FEBS Lett.* 269, 311-314.
- Mahy, B.W. J (Ed); 2005. *Foot-and Mouth Disease Virus. Current Topics in Microbiology and Immunology.* Volume 288, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.

- MacFarlane SA, Wallis CV, Taylor SC, Goulden MG, Wood KR, Davies JW. 1991. Construction and analysis of infectious transcripts synthesized from full-length cDNA clones of both genomic RNAs of pea early browning virus. *Virology*. ;182(1):124-9.
- Malirat, V.; Bergmann, I.E.; Augé de Mello, P.; Tiraboschi, B.; Beck, E. and Gomes, I. (1994). Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Research* 34: 31-48.
- Malirat, V., Bergmann, I.E., Mendonca Campos, R., Conde, F., Quiroga, J.L., Villamil, M., Salgado, G., Ortiz, S., 2012. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus type A in South America. *Vet. Microbiol.* 158, 82–94.
- Malirat, V., Bergmann, I.E., Mendonca Campos, R., Salgado, G., Sanchez Marti´nez, C., Conde, F., Quiroga, J.L., Ortiz, S., 2011. Phylogenetic analysis of foot-and-mouth disease virus type O circulating in the Andean region of South America during 2002–2008. *Vet. Microbiol.* 152, 74–87.
- Malirat V, Franca de Barros JJ, Bergmann IE, Mendonca Campos R, Neitzert E, Veiga da Costa E, da Silva EE, Falczuk AJ, Pinheiro DS, de Vergara N, Cirvera JL, Maradei E, Di Landro R. Phylogenetic analysis of foot-and-mouth disease virus type O re-emerging in free areas of South America. *Virus Res* 2007;124:22-8.
- Maradei, E., Perez Beascochea, C., Malirat, V., Salgado, G., Seki, C., Pedemonte, A., Bonastre, P., D’Aloia, R., La Torre, J.L., Mattion, N., Rodríguez Toledo, J., Bergmann, I.E., 2011. Characterization of foot-and-mouth disease virus from outbreaks in Ecuador during 2009-2010 and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. *Vaccine* 29, 8230–8240.
- Maradei, E., Malirat, V., Perez Beascochea, C., Oviedo Benitez, E., Pedemonte, A., Seki, C., Galdo Novo, S., Balette, C., P., D’Aloia, R., La Torre, J.L., Mattion, N., Rodríguez Toledo, J., Bergmann, I.E., Characterization of a type O Foot-and-mouth disease virus re-emerging in the year 2011 in free areas of the Southern Cone of South America and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. *Vet Microbiol* 162 (2013) 479–490
- Martin, L.R. and Palmenberg, A.C. 1996. Tandem mengovirus 5' pseudoknots are linked to viral RNA synthesis, not poly(C)-mediated virulence. *J. Virol.* 70:8182–8186
- Martin-Acebes M.A, 2009, Mecanismos de entrada y de organización del complejo de replicación del virus de la fiebre aftosa: estudio comparativo con el virus de la enfermedad vesicular del cerdo y el virus de la estomatitis vesicular, TESIS DOCTORAL, Universidad Autónoma de Madrid
- Martínez-Salas, E., Ortín, J., y Domingo, E. (1985). Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene* 35(1-2), 55-61.
- Martinez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E., Lopez de Quinto, S., 2001. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J. Gen. Virol.* 82, 973-984.
- Martinez-Salas, E., Lopez de Quinto, S., Ramos, R., Fernandez-Miragall, O., 2002, IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* 84, 755-763.
- Mason, P.W., Bezborodova, S.V. y Henry, T.M. (2002). Identification and characterization of a cisacting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 76, 9686-94
- Mason, P.W., Grubman, M.J. y Baxt, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* 91, 9-32

- Mason, P. W., M. E. Piccone, T. S. McKenna, J. Chinsangaram, and M. J. Grubman. 1997. Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* 227:96-102.
- Mateo, R., Díaz, A., Baranowski, E. y Mateu, M.G. (2003). Complete alanine scanning of intersubunit interfaces in foot and mouth disease virus capsid reveals critical contributions of many side chains to particle stability and viral function. *J. Biol. Chem.* 278, 41019-27
- Mateu, M.G. (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* 38, 1-24
- Mateu, M.G. y Verdaguer, N. (2004). Functional and structural aspects of the interaction of foot-and-mouth disease virus with antibodies. En: Sobrino, F. y Domingo, E. (eds.). *Foot and mouth disease. Current perspectives*, pp 77-92. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Mateu, M.G., Da Silva, J.L., Rocha, E., De Brum, D.L., Alonso, A., Enjuanes, L., Domingo, E., Barahona, H., 1988, Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology* 167, 113-124.
- Mateu, M.G., Martínez, M.A, Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. y Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* 71, 629-37
- Mateu, M.G., Valero, M.L., Andreu, D. y Domingo, E. (1996). Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J Biol Chem* 271, 12814-9
- Mattion N, König G, Seki C, Smitsaart E, Maradei E, Robiolo B, Duffy S, León E, Piccone M, Sadir A, Bottini R, Cosentino B, Falczuk A, Maresca R, Periolo O, Bellinzoni R, Espinoza A, Torre JL, Palma EL. Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterization of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease. *Vaccine* 2004;22:4149-62.
- Mattion N, Goris N, Willems T, Robiolo B, Maradei E, Perez Beascochea C, Perez A, Smitsaart E, Fondevila N, Palma E, De Clercq K, La Torre J. Some guidelines for determining foot-and-mouth disease vaccine strain matching by serology. *Vaccine* 2009;27:741-47.
- McCullough, K., De Simone, F., Brocchi, E., Capucci, L., Crowther, J. R. & Kihm, U. 1992. Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J Virol*, 66, 1835-1830.
- McKenna, T.S., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B. y Mason, P.W. (1995). Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol* 69, 5787-90
- McInerney Gerald M., King Andrew M. Q., Ross-Smith Natalie and Belsham Graham J.. Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences. *Journal of General Virology* (2000), 81, 1699–1702.
- Medina, M., Domingo, E., Brangwyn, J.K. and Belsham, G.J. 1993. The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* 194:355–359
- Mendez E, Ruggli N, Collett MS, Rice CM. Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J Virol*. 1998;72(6):4737-45.
- Milligan, J. F., D. R. Groebe, G. W. Witherell y O. C. Uhlenbeck. 1987. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res* 15:8783-98.

- Mizutani, S., and Colonno, R. J. (1985). In vitro synthesis of an infectious RNA from cDNA clones of human rhinovirus type 14. *J. Virol.* 56, 628-632.
- Moffat, K., Knox, C., Howell, G., Clark, S. J., Yang, H., Belsham, G. J., Ryan, M. & Wileman, T. (2007). Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J Virol* 81, 1129-39.
- Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., Wileman, T., 2004, The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK- 38 cells. *J Gen Virol* 85, 933-946.
- Monaghan, P., S. Gold, J. Simpson, Z. Zhang, P.H. Weinreb, S.M. Violette, S. Alexandersen, and T. Jackson, 2005: The alpha(v)beta6 integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J. Gen. Virol.* 86(Pt 10), 2769–2780.
- Moraes, M.P., Chinsangaram, J., Brum, M.C., Grubman, M.J., 2003, Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine. *Vaccine* 22, 268-279.
- Morelli MJ, Wright CF, Knowles NJ, Juleff N, Paton DJ, King DP, Haydon DT. 2013. Evolution of foot-and-mouth disease virus intra-sample sequence diversity during serial transmission in bovine hosts. *Vet Res.*, 44(1):12.
- Mulcahy, G., Gale, C., Robertson, P., Iyisan, S., DiMarchi, R.D., Doel, T.R., 1990, Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 8, 249-256.
- Murphy, F. A., van Regenmortel, M. H. V. (eds). *Applied Virology Research*, pp.233-266. Plenum Press, New York.
- Murray, K. E., y D. J. Barton. 2003. Poliovirus “CRE”-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 77:4739-50.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., y Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* 79(12), 7698-706.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., Woolaway, K. E., Birtley, J., Curry, S., y Belsham, G. J. (2006). Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol* 80(19), 9865-75.
- Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P.W., Blystone, S.D., Brown, E.J., Baxt, B., 1998, Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J Virol* 72, 3587-3594.
- Newman JF, Brown F, 1997, Foot-and-mouth disease virus and poliovirus particles contain proteins of the replication complex. *J Virol.* 71(10):7657-62.
- Newman, J. F., Rowlands, D. J., y Brown, F. (1973). A physico-chemical sub-grouping of the mammalian picornaviruses. *J Gen Virol* 18(2), 171-80.
- Newman, J.F., Cartwright, B., Doel, T.R., Brown, F., 1979. Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 45, 497/507.
- Newman, J. F. E., P. G. Piatti, B. M. Gorman, T. G. Burrage, M. D. Ryan, M. Flint, and F. Brown. 1994. Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:733–737.

- Nomoto, A., Detjen, B., Pozzatti, R., Wimmer, E., 1977, The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 268, 208-213.
- Novak, J.E., Kirkegaard, K., 1991, Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* 65, 3384-3387.
- Nuñez, J.I., E. Baranowski, N. Molina, C.M. Ruiz-Jarabo, C. Sanchez, E. Domingo, and F. Sobrino, 2001: A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J. Virol.* 75, 3977–3983.
- O'Donnell, V., LaRocco, M., Duque, H., Baxt, B., 2005, Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J Virol* 79, 8506-8518.
- Organización Mundial de Salud Animal (OIE).– Fiebre Aftosa. En: Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 2012. Chapter 2.1.5, OIE, Paris.
- Palmenberg AC., 1990, Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol.*; 44:603-23
- Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J. and Wright, D. A. (1996). "Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency.". *Strategies* 9 (3): 3–4.
- Parida S, Anderson J, Cox S, Barnet PV and paton DJ. (2006). Secretory Ig A as an indicator of oropharyngeal FMDV replication. *Vaccine* 24:1107-1116.
- Parida S, Fleming L, Oh Y, Mahapatra M, Hamblin P, Gloster J, Doel C, Gubbins S and Paton DJ (2007). Reduction of foot-and-mouth disease (FMD) virus load in nasal excretions, saliva and exhaled air of vaccinated pigs following direct contact challenge. *Vaccine*, 25 (45), 7806-7817
- Parry N., Fox G., Rowlands D., Brown F., Fry E., Acharya R., Logan D. & Stuart D. (1990). - Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 347, 569-572.
- Parsley, T. B., J. S. Towner, L. B. Blyn, E. Ehrenfeld, y B. L. Semler. 1997. Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'- terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA* 3:1124-34.
- Paton DJ, Valarcher JF, Bergmann IE, Matlho OG, Zakharov VM, Palma EL, Thomson GR. Selection of foot-and-mouth disease vaccine strains – a review. *Rev. sci.tech. Off. Int. Epiz.* 2005;24(3):981-993.
- Paul, A. V. (2002). Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, pp. 227-246. Edited by B. L. Semler & E. Wimmer. Washington, DC: ASM Press.
- Paul, A.V., Cao, X., Harris, K.S., Lama, J., Wimmer, E., 1994, Studies with poliovirus polymerase 3Dpol. Stimulation of poly(U) synthesis in vitro by purified poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem* 269, 29173-29181.
- Paul, A.V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J.H., Wimmer, E., 2003, Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* 77, 891-904.
- Paul, A. V., Rieder, E., Kim, D. W., van Boom, J. H. & Wimmer, E. (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 74, 10359-70.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. & Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* 393, 280-4.

- Pay, T.W., Hingley, P.J., 1992, A potency test method for foot and mouth disease vaccine based on the serum neutralizing antibody response produced in cattle. *Vaccine* 10, 707-713.
- Pelletier, J., Sonenberg, N., 1989, Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *J Virol.*; 63(1): 441-444.
- Pereira, H.G., 1977, Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Developments in Biological Standardization* 35, 167-174.
- Pereira, H.G., 1981, Foot-and-mouth disease. *Virus Diseases of Food Animals* 2, 333- 363.
- Periolo, O.H., Seki, C., Grigera, P.R., Robiolo, B., Fernandez, G., Maradei, E., D'Aloia, R., La Torre, J.L., 1993, Large-scale use of liquid-phase blocking sandwich ELISA for the evaluation of protective immunity against aphthovirus in cattle vaccinated with oil-adjuvanted vaccines in Argentina. *Vaccine* 11, 754-760.
- Pfaff, E., Thiel, H.J., Beck, E., Strohmaier, K., Schaller, H., 1988, Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 62, 2033-2040.
- Piccone, M.E., Kaplan, G., Giavedoni, L., Domingo, E., and Palma, E.L., 1988, VP1 of serotype C foot-and-mouth disease viruses: long-term conservation of sequences. *J Virol.*; 62(4): 1469-1473.
- Piccone, M.E., Rieder, E., Mason, P.W. and Grubman, M.J. 1995a. The foot-and-mouth-disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J. Virol.* 69:5376-5382
- Piccone, M.E., Zellner, M., Kumosinski, T.F., Mason, P.W. and Grubman, M.J. 1995b. Identification of the active-site residues of the L-proteinase of foot-and-mouth-disease virus. *J. Virol.* 69:4950-4956.
- Piñeiro D, Ramajo J, Bradrick SS, Martínez-Salas E. 2012. Gemin5 proteolysis reveals a novel motif to identify L protease targets. *Nucleic Acids Res.* 40(11):4942-53.
- Pleij CW. .1990, Pseudoknots: a new motif in the RNA game. *Trends Biochem Sci*;15(4):143-7. Review
- Polatnick, J., Arlinghaus, R.B., 1967. Foot-and-mouth disease virus-induced ribonucleic acid polymerase in baby hamster kidney cells. *Virology* 31, 601/608.
- Porter, A.G., 1993, Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol* 67, 6917-6921.
- Porter, A.G., Fellner, P., Black, D.N., Rowlands, D.J., Harris, T.J., Brown, F., 1978, 3'- Terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. *Nature* 276, 298-301.
- Quillet L, Guilley H, Jonard G, Richards K. 1989. In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology.*, 172(1):293-301.
- Racaniello, V.R. (2007). Picornaviridae: The viruses and their replication. En: Knipe D. M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus S.E. (eds). *Fields Virology*. pp 795- 838. Wolters Kluwer/ Lippincot Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science.* 1981;214(4523):916-9.
- Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. 1989. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol.*, 1(3):285-96.

- Rieder, E., Bunch, T., Brown, F. y Mason, P.W. (1993). Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol* **67**, 5139-45
- Rieder E, Henry T, Duque H and Baxt B. Analysis of a foot-and-mouth disease virus type A24 isolate containing an SGD receptor recognition site in vitro and its pathogenesis in cattle. *J Virol* 2005, 79: 12989–12998.
- Rieder, E., Paul, A.V., Kim, D.W., van Boom, J.H., Wimmer, E., 2000, Genetic and Biochemical Studies of Poliovirus cis-Acting Replication Element cre in Relation to VPg Uridylation *J Virol.*;74(22): 10371–10380.
- Roberts, P. and Belsham, G.J. 1995. Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus Leader protein, a cysteine protease. *Virology* 213:140–146 CrossRef
- Robertson, B.H., Moore, D.M., Grubman, M.J., Kleid, D.G., 1983, Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP1 on foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 46, 311-316.
- Robiolo, B., Grigera, P.R., Periolo, O.H., Seki, C., Bianchi, T., Maradei, E., La Torre, J.L., 1995, Assessment of foot and mouth disease vaccine potency by liquidphase locking ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina. *Vaccine* 13, 1346-1352.
- Robiolo, B., La Torre, J., Maradei, E., Perez Beascochea, C., Perez, A., Seki, C., Smitsaart, E., Fondevila, N., Palma, E., Goris, N., De Clercq, K., Mattion, N., 2010, Confidence in indirect assessment of foot-and-mouth disease vaccine potency and vaccine matching carried out by liquid phase ELISA and virus neutralization tests. *Vaccine* 28, 6235–6241.
- Romanutti C, D'Antuono A., Palacios C, Quattrocchi V, Zamorano P, La Torre J, Mattion N. Evaluation of the immune response elicited by vaccination with viral vectors encoding FMDV capsid proteins and boosted with inactivated virus. 2013. *Vet Mic*. En prensa.
- Rowlands, D. J. (1999).Foot-and-mouth disease virus (Picornaviridae).In *Encyclopedia of Virology*.Edited by A. Granoff & R. G. Webster. London: Academic Press.
- Rowlands, D.J., Harris, T.J., Brown, F., 1978, More precise location of the polycytidylic acid tract in foot and mouth disease virus RNA. *J Virol* 26, 335-343.
- Rweyemamu MM. Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J Biol Standards* 1984;12(3):323-37.
- Ryan, M.D., Drew, J., 1994, Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J* 13, 928-933.
- Ryan, M. D., y Flint, M., 1997. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol* 78 (Pt 4):699-723.
- Ryan, M. D., G. J. Belsham, y A. M. King. 1989. Specificity of enzymesubstrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. *Virology* 173:35-45
- Ryan, M., D., King, A., M., Q., Thomas, G., P., 1991, Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence *Journal of General Virology* 72, 2727-2732.
- Ryan, M. D., Donnelly, M. L. L., Flint, M., Cowton, V. M., Luke, G., Hughes, L. E., Knox, C., y De Felipe, P. (2004).Foot-and-mouth disease virus proteinases.En "Foot and mouth disease: Current perspectives" (F. Sobrino, y E. Domingo, Eds.). Horizon Bioscience,Norfolk.

- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A. & Mason, P. W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol* 71, 5115–5123.
- Sage DR, Chillemi AC, Fingerroth JD. 1998. A versatile prokaryotic cloning vector with six dual restriction enzyme sites in the polylinker facilitates efficient subcloning into vectors with unique cloning sites. *Plasmid*. 40(2). 164-8.
- Saiz, M., Gomez, S., Martinez-Salas, E. & Sobrino, F. (2001). Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* 82, 93-101.
- Sakamoto, K., Yoshida, K., 2002, Recent outbreaks of foot and mouth disease in countries of east Asia. *Rev Sci Tech* 21, 459-463.
- Salt, J.S. (1993). The carrier state in foot and mouth disease: an immunological review. *Br Vet J* 149, 207-23
- Salt J., 2004, Persistence of foot-and-mouth disease. In *Foot and mouth disease; current perspectives*, ch. 6 (eds Sobrino F., Domingo E.), pp. 103–143. Wymondham, UK: Horizon Bioscience.
- Samuel, A.R. y Knowles, N.J. (2001). Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry. *Trends Genet* 17, 421-4
- Sangar DV, Black DN, Rowlands DJ, Brown F., 1977, Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. *J Gen Virol*. 35(2):281-97.
- Saravanan T., Ashok Kumar C., Reddy G. R., Dechamma H. J., Nagarajan G., Ravikumar P., Srinivas G. and Suryanarayana V. V. S.. 2011. Construction of genome-length cDNA for foot-and-mouth disease virus serotype Asia 1 IND 63/72 vaccine strain. *IJBMBR*. 2(2), pp. 39-45. <http://www.academicjournals.org/IJBMBR>
- Sarnow, P., Jacobson, S. J., and Najita, L. (1990). Poliovirus genetics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 161, 155-188.
- Schenborn ET, Mierendorf RC (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucl Acids Res* 13: 6223–6236.
- Schlegel, A., T. H. Giddings, Jr., M. S. Ladinsky, y K. Kirkegaard. 1996. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* 70:6576-88.
- Schudel, A.A., 1986, Fiebre aftosa. *Adel. de Microbiol. Enf.Infecc* 5, 22.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*. 31: 3381-3385.
- Seki, C., Robiolo, B., Periolo, O., Iglesias, M., D'Antuono, A., Maradei, E., Barros, V., La Torre, J., and N. Mattion. Rapid methodology for antigenic profiling of FMDV field strains and for the control of identity, purity and viral integrity in commercial virus vaccines using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol* 2009, 133: 239–251
- Sellers, R.F., 1971, Quantitative aspects of the spread of foot-and-mouth disease. *Vet. Bull.* 41, 431.
- Semler, B. L., Dorner, A. J., and Wimmer, E. (1984). Production of infectious poliovirus from cloned cDNA is dramatically increased by SV40 transcription and replication signals. *Nucleic Acids Res*. 12, 5123-5141.
- Serrano, P., Pulido, M. R., Saiz, M., y Martinez-Salas, E. (2006). The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol* 87(Pt 10), 3013-22.

- Shahan, M.S., 1962, The virus of foot-and-mouth disease. *Ann N Y Acad Sci* 101, 444- 454.
- Shieh, J.J., Liang, C.M., Chen, C.Y., Lee, F., Jong, M.H., Lai, S.S., Liang, S.M., 2001, Enhancement of the immunity to foot-and-mouth disease virus by DNA priming and protein boosting immunization. *Vaccine* 19, 4002-4010.
- Sierra, M., A. Airaksinen, C. Gonzalez-Lopez, R. Agudo, A. Arias, and E. Domingo. 2007. Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol* 81:2012-2024.
- Skotnicki ML, Ding SW, Mackenzie AM, Gibbs AJ. 1993. Infectious eggplant mosaic tymovirus and ononis yellow mosaic tymovirus from cloned cDNA. *Arch Virol.*;131(1-2):47-60.
- Smitsaart, E., Mattion, N.; Filippi, J.; Robiolo, B.; Periolo, O.; La Torre, J. & Bellinzoni, R.2000. Enhancement of the immune response induced by the inclusion of saponin in oil adjuvanted vaccines against foot-and-mouth disease. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of FMD. Borovets, Bulgaria. *App* 32.255-262.
- Sobrinho F. y Domingo, E. eds. (2004). *Foot and mouth disease. Current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk.
- Sobrinho, F., M. Davila, J. Ortin, and E. Domingo. 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128:310-318.
- Sobrinho, F., Sáiz, M., Jiménez-Clavero, M.A., Núñez, J.I., Rosas, M.F., Baranowski, E. y Ley, V.(2001). Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res* 32, 1-30
- Stoker, M. and MacPherson, I., (1964) 'Syrian hamster fibroblast cell line BHK 21 and its derivatives', *Nature*, 203, 1355-1357
- Strauss Daniel M. and Wuttke Deborah S. 2007. Characterization of Protein-Protein Interactions Critical for Poliovirus Replication: Analysis of 3AB and VPg Binding to the RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol.* 81 (12). 6369–6378
- Strebel, K., Beck, E., 1986, A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* 58(3): 893–899
- Strebel K, Beck E, Strohmaier K and Schaller H. 1986. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.*, 57(3):983.
- Strohmaier, K., Adam, K.H., 1976, [Structure of foot-and-mouth disease virus]. *Zentralbl Veterinarmed B* 23, 483-506.
- Strohmaier, K., Franze, R., Adam, K.H., 1982, Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J Gen Virol* 59, 295-306.
- Steil, B.P., y Barton, D.J., 2009, Cis-Active RNA Elements (CREs) and Picornavirus RNA Replication. *Virus Res.*; 139(2): 240–252.
- Sumiyoshi H, Hoke CH, Trent DW. 1992. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J Virol.*, 66(9):5425-31.
- Sutmoller P, Gaggero A. Foot and mouth disease carriers. *Vet Rec* 1965;77:968-9
- Sutmöller, P., McVicar, J.W., Cottral, G.E., 1968, The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch Gesamte Virusforsch* 23, 227-235.

- Sutmöller, P., Barteling, S.J., Olascoaga, R.C. y Sumption, K.J. (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 91, 101–144.
- Taboga, O., C. Tami, E. Carrillo, J. I. Núñez, A. Rodríguez, J. C. Saíz, E. Blanco. 1997. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J. Virol.* 71:2606-2614.
- Takada Y, Ye X, Simon S., 2007, The integrins. *Genome Biol*, 8:215.
- Takeda, N., Kuhn, R. J., Yang, C. F., Takegami, T. & Wimmer, E. (1986). Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J. Virol.* 60, 43-53.
- Tesar, M., Marquardt, O., 1990. Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology* 174, 364/374.
- Teterina, N. L., A. E. Gorbalenya, D. Egger, K. Bienz, y E. Ehrenfeld. 1997. Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol* 71:8962-72.
- Thompson, D., Muriel, P., Russell, D., Osborne, P., Bromley, A., Rowland, M., Creigh-Tyte, S. y Brown, C. (2002). Economic costs of the foot-and-mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev. Sci. Tech.* 21, 675–87.
- Tiley L, King AM, Belsham GJ., 2003, The foot-and-mouth disease virus cis-acting replication element (cre) can be complemented in trans within infected cells. *J Virol.*;77(3):2243-6.
- Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. y Barlough J.E. (1988) En: Hagan and Bruner's *Microbiology and infectious diseases of domestic animals*, pp. 647-667. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca.
- Toja, M., Escarmis, C., Domingo, E., 1999, Genomic nucleotide sequence of a footand- mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res* 64, 161-171.
- Tully, D. C., y Fares, M. A. (2008). The tale of a modern animal plague: Tracing the evolutionary history and determining the time-scale for foot and mouth disease virus. *Virology*382(2):250-6
- Urban Andreas, Neukirchen Susanne and Jaeger Karl-Erich. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Research*, 1997, Vol. 25, No. 11 2227–2228
- Valarcher, J.F., Leforban, Y., Rweyemamu, M., Roeder, P.L., Gerbier, G., Mackay, D.K., Sumption, K.J., Paton, D.J., Knowles, N.J., 2008. Incursions of foot-and-mouth disease virus into Europe between 1985 and 2006. *Transbound. Emerg. Dis.* 55 (1), 14–34.
- Van Bekkum JG, Frenkel HS, Frederiks HHJ, Frenkel S. Observations on the carrier state of cattle exposed to foot and mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeesk* 1959;84:1159-64.
- Van Bekkum, J.G. 1969. Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMDV. (Rome), pp. 38-41.
- van der Werf S, Bradley J, Wimmer E, Studier FW, Dunn JJ. Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(8):2330-4.
- van Dinten LC, den Boon JA, Wassenaar AL, Spaan WJ, Snijder EJ. An infectious arterivirus cDNA clone: identification of a replicase point mutation that abolishes discontinuous mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(3):991-6.

- van Lierop, M.J., Wagenaar, J.P., van Noort, J.M., Hensen, E.J., 1995, Sequences derived from the highly antigenic VP1 region 140 to 160 of foot-and-mouth disease virus do not prime for a bovine T-cell response against intact virus. *J Virol* 69, 4511-4514.
- Van Maanen, C., Terpstra, C., 1989, Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines. *J Immunol Methods* 124, 111-119.
- van Ooij, M. J., D. A. Vogt, A. Paul, C. Castro, J. Kuijpers, F. J. van Kuppeveld, C. E. Cameron, E. Wimmer, R. Andino, y W. J. Melchers. 2006. Structural and functional characterization of the coxsackievirus B3 "CRE"(2C): role of "CRE"(2C) in negative- and positive-strand RNA synthesis. *J Gen Virol* 87:103-13.
- van Rensburg H G and Mason P W 2002 Construction and evaluation of a recombinant foot-and-mouth disease virus: implications for inactivated vaccine production; *Ann. N. Y.Acad. Sci.* 969 83–87
- van Rensburg HG, Henry TM and Mason PW. Studies of genetically defined chimeras of a European type A virus and a south African Territories type 2 virus reveal growth determinants for foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* 2004, 85: 61–68.
- van Vlijmen, H.W., Curry, S., Schaefer, M., Karplus, M., 1998, Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol* 275, 295-308.
- Vasquez C, Denoya CD, La Torre JL, Palma EL. Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology*. 1979 Aug;97(1):195–200.
- Verdaguer, N., Schoehn, G., Ochoa, W. F., Fita, I., Brookes, S., King, A., Domingo, E., Mateu, M. G., Stuart, D. & Hewat, E. A. (1999). Flexibility of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus bound to a Fab fragment of a neutralizing antibody: structure and neutralization. *Virology* 255, 260±268.
- Villen, J., Borrás, E., Schaaper, W.M., Meloen, R.H., Davila, M., Domingo, E., Giralt, E., Andreu, D., 2002, Functional mimicry of a discontinuous antigenic site by a designed synthetic peptide. *ChemBiochem* 3, 175-182.
- Wang, C.Y., Chang, T.Y., Walfield, A.M., Ye, J., Shen, M., Chen, S.P., Li, M.C., Lin, Y.L., Jong, M.H., Yang, P.C., Chyr, N., Kramer, E., Brown, F., 2002, Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine* 20, 2603-2610.
- Wang D, Fang L, Bi J, Chen Q, Cao L, Luo R, Chen H, Xiao S. 2011. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced RANTES transcription in PK-15 cells. *Virus Genes*. 42(3):388-93.
- Wang D, Fang L, Liu L, Zhong H, Chen Q, Luo R, Liu X, Zhang Z, Chen H, Xiao S. (20011).Foot-and-mouth disease virus (FMDV) leader proteinase negatively regulates the porcine interferon-λ1 pathway. *Mol Immunol* 2011. 49(1-2):407-12.
- Wang Jeng-Hwan, Liang Chi-Ming, Peng Jei-Ming, Shieh Jeng-Jer, Jong Ming-Hwa, Lin Yeou-Liang, Sieber Martin, Liang Shu-Mei . 2003. Induction of immunity in swine by purified recombinant VP1 of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* ; 21; 3721–3729
- Weissman, C., 1989, Single-strand RNA. *Nature* 337, 415-416.
- Wigdorovitz, A., Sadir, A., 1996, [Mechanisms involved in the prolonged humoral immune response: behavior of aphthous fever virus]. *Rev Argent Microbiol* 28, 45-54.
- Wimmer, E., Hellen, C. U. T., and Cao, X. M. (1993).Genetics of poliovirus.*Annu. Rev.Genet.* 27, 353-436.

- Witwer, C., Rauscher, S., Hofacker, I. L. & Stadler, P. F. (2001). Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res* 29, 5079-89.
- Xiang, W., Paul, A. V., and Wimmer, E. (1997). RNA signals in entero- and rhinovirus genome replication. *Semin. Virol.* 8, 256-273.
- Xiang, W., Harris, K.S., Alexander, L., Wimmer, E., 1995, Interaction between the 5'- terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol* 69, 3658-3667.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K. & Wimmer, E. (1998). Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3D pol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J. Virol.* 72, 6732-6741.
- Xiang Z. and Honig, B. 2001. Extending the accuracy limits of prediction for side-chain conformations. *J. Mol. Biol.* 311: 421-430.
- Zamorano, P., Wigdorovitz, A., Chaher, M.T., Fernandez, F.M., Carrillo, C., Marcovecchio, F.E., Sadir, A.M., Borca, M.V., 1994, Recognition of B and T cell epitopes by cattle immunized with a synthetic peptide containing the major immunogenic site of VP1 FMDV 01 Campos. *Virology* 201, 383-387.
- Zhang ZD, Hutching G, Kitching P, Alexandersen S., 2002, The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells. *Arch Virol*;147(11):2157-67
- Zheng HX, Tian H, Jin Y, Wu JY, Shang YJ, Yin SH and Liu XT,. Development of a hamster kidney cell line expressing stably T7 RNA polymerase using retroviral gene transfer technology for efficient rescue of infectious foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods* 2009, 156: 129-137.
- Zibert, A., Maass, G. Strebel, K., Falk, M.M. y Beck, E. (1990). Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J. Virol.* 64, 2467-73.
- Zimmermann A, Nelsen-Salz B, Kruppenbacher JP, Eggers HJ. The complete nucleotide sequence and construction of an infectious cDNA clone of a highly virulent encephalomyocarditis virus. *Virology.* 1994;203(2):366-72.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3406-15.