



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Bases moleculares de la estabilidad de la cápsida de los aftovirus

Flavia Caridi, Licenciada en Biología

Directores de Tesis: Francisco Sobrino Castelló y Miguel Ángel Martín Acebes

Madrid, 2017

FRANCISCO SOBRINO CASTELLÓ, PROFESOR DE INVESTIGACION DEL CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA, Y MIGUEL ÁNGEL MARTÍN ACEBES, INVESTIGADOR CONTRATADO DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA

CERTIFICAN que la investigación de doctorado que lleva por título: “Bases moleculares de la estabilidad de la cápsida de los aftovirus”, se ha realizado bajo su dirección por la licenciada en Biología Flavia Caridi.

En los términos establecidos por la normativa reguladora de los Estudios de Tercer Ciclo y Doctorado de la Universidad Autónoma de Madrid, se autoriza la presentación de este trabajo como investigación de Tesis Doctoral para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Madrid, a 02 de Marzo de 2017

Francisco Sobrino Castelló

Miguel Ángel Martín Acebes

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” y financiado por una beca predoctoral de Formación del Personal Investigador (FPI) del CSIC. Durante esta Tesis Doctoral se realizó una estancia de 120 días en “Institute of Virology and Immunology (IVI)” (Mittelhausern, Suiza) en el laboratorio del Dr. Artur Summerfield financiada por la beca predoctoral FPI del CSIC.

*A mis chicos,
Jaime y Adrián*

AGRADECIMIENTOS

Llegó por fin el momento, mi momento, de leer la Tesis. Y con ello, lo de agradecer a todas las personas que en estos años han contribuido a que llegara este momento, ayudándome, apoyándome, aconsejándome y haciéndolo de forma que mi día día en el CBM fuera ameno porque la verdad nunca te llegas aburrir con este trabajo y con tanta buena gente alrededor. No pudiera haber sido más afortunada.

Mi primero gracias, de corazón, va a mis directores de Tesis. A Pachi, por haber confiado en mí y haberme brindado la oportunidad de ponerme en juego. Por ser un óptimo jefe y una excelente persona. A Miguel, por su infinito optimismo y paciencia, por todas las cosas que sabe y que me ha enseñado, por ser una guía insustituible en este mundo de la ciencia. A Charo, que en su día me abrió las puertas del laboratorio 105 y que siempre la recordaré con mucho cariño.

Mil gracias a mis compañeros de labo, con los que he compartido muchos momentos bonitos, que se han convertidos en amigos importantes y especiales. A Angelita, por haberme ofrecido su experiencia, su amistad y su cariño desde el primer día, y a Mónica, siempre tan cercana, aun estando al otro lado del océano como lo está ahora. Gracias a Marga, por todas nuestras charlas en el comedor y por su apoyo científico y a Miguel R. por su disponibilidad. Gracias a Yuri, por ser tan peculiar. Gracias a Rodrigo, por su simpatía y su amabilidad, fue una alegría que te quedaras en el labo. Y gracias a estas dos chicas encantadoras, Pepa y Patricia, compañeras de cultivos y ahora también de labo, sin duda una suerte para nosotros. Gracias a los nuevos fichajes del laboratorio: Laura y Elisa. Gracias a Belén, por ser un apoyo en el CISA y por sus visitas siempre agradables. Gracias a los muchos americanos que han pasado por el laboratorio 105, que cada verano vienen a traer una ola de juventud y alegría: en particular a Carlos, mi primer 'alumno', por lo mucho que nos hemos reído juntos, a Melisa, por esa sonrisa que abría el corazón. Gracias a Kathy, mi querida peruana, he disfrutado mucho de tu compañía.

Gracias a las compis del Desayuno, porque siempre hay que encontrar este momento para tomar un café, que nunca es un café, sino una forma de desahogarse un poco. A Elena, has sido una amiga fantástica en este largo recorrido que hemos hecho juntas, de principio a fin, a Esther, por nuestros cotilleos y por la tranquilidad que me transmites. A Desi y Cristina, por estar allí en mis primeros meses en el CBM.

Gracias a los compis del laboratorio 121, Ana I, Isabel y Celia, siempre tan disponibles a la hora de prestar un reactivo o compartir un protocolo. A Ana O., por ser tan abierta y espontánea. A Nacho, mi compañero de experimentos, con el que he compartido alegrías, penas y muchas risas. Que te vaya fenomenal en esas tierras adonde te has marchado. Y gracias al jefe de este laboratorio, Esteban Domingo por estas reuniones científicas en las que siempre salían ideas nuevas.

Gracias a los compis de cultivos, porque el P2 virus gracias a ellos es un lugar muy divertido y agradable. En particular, a Mari Angel y Nuncia, que cada día cumplen con su mil tareas pero siempre tienen un rato para preguntarte que tal estas, a Mercedes, que nos da buenos consejos, a Bruno y Rocío, con su buen humor contagioso. Gracias a la gente del laboratorio 205, nuestros vecinos de cabina, a los que se han ido: Mila, Vero, Pablo y los que están: Silvia, Alicia.

Gracias a las chicas del INIA, a Estela, a Ana, a Nereida por su simpatía y empatía, por hacer que los congresos fueran experiencias tan amenas y por las quedadas fuera del lugar de trabajo. Gracias a Juan Carlos Saiz, por su buen humor y por elegir tan bien su gente.

Gracias a mi familia, que me ha apoyado desde lejos y desde cerca, creyendo en mi de forma incondicional. Mil gracias a mis padres, Caterina y Francesco, no estaría aquí sin vosotros, y a mis hermanos, Paola e Giuseppe, por aceptarme y quererme por lo que soy.

Gracias a mí 'nueva' familia: a Jaime, mi compañero de vida, por cuidarme mucho, por comprenderme y caminar a mi lado y a ti, Adrián, mi pequeño grande milagro, por llenar de significado cada instante de mi vida.

RINGRAZIAMENTI (AGRADECIMIENTOS EN ITALIANO)

Finalmente è arrivato il momento, il mio momento, di discutere la Tesi. E anche quello di ringraziare tutte le persone che in questi anni hanno contribuito alla sua realizzazione, aiutandomi, appoggiandomi, consigliandomi e facendo in modo che andare al lavoro fosse un piacere perché con tante belle persone intorno non ti annoi mai. Non potrei essere stata più fortunata.

Il mio primo ringraziamento, di cuore, va ai miei direttori di Tesi. A Pachi, ottimo capo e persona eccellente, per aver creduto in me e avermi dato la opportunità di mettermi in gioco. A Miguel, per il suo infinito ottimismo e pazienza, per tutte le cose che sa e che mi ha insegnato, per essere una guida insostituibile nel mondo della scienza. A Charo, che mi ha aperto la porta del laboratorio 105, e che ricorderò sempre con molto affetto.

Grazie mille ai miei colleghi di laboratorio, con i quali ho condiviso molti bei momenti e che sono diventati degli amici importante e speciali. A Angelita, per avermi offerto la sua esperienza, la sua amicizia e il suo affetto fin dal primo giorno, a Monica, sempre così vicina anche adesso che vive dall'altro lato dell'oceano. Grazie a Marga, per tutte le nostre conversazioni nella sala mensa e il suo appoggio scientifico e a Miguel R. per la sua disponibilità. Grazie a Yuri per essere così particolare. Grazie a Rodrigo, per essere così simpatico e amabile, che allegria che rimanessi nel laboratorio. E grazie a Pepa y Patricia, due bellissime persone, colleghe della sala di coltura cellulare e adesso anche, per nostra immensa fortuna, di laboratorio. Grazie alle nuove conquiste del laboratorio: Laura e Elisa. Grazie a Belen, per essere il nostro appoggio nel CISA e per le sue visite nel CBM. Grazie ai molti americani che sono passati dal laboratorio 105 e che ogni estate vengono a portarci un'ondata di gioventú e allegria: in particolare a Carlos, il mio primo 'alunno', per le risate che ci siamo fatti insieme, a Melisa, per il suo sorriso che apre il cuore. Grazie a Kathy, la mia amata peruviana, é stato bello godere per un pó della tua compagnia.

Grazie ai miei compagni della pausa mattutina, perché bisogna sempre trovare il momento per prendere questo caffè che non é mai un caffè e approfittarne per sfogarsi un poco. A Elena, sei stata un'amica fantastica in questo lungo cammino che abbiamo fatto insieme, dall'inizio alla fine, a Esther, per i nostri pettegolezzi e per trasmettermi tranquillità. A Desi y Cristina, per essere stati presenti nei miei primi mesi nel CBM.

Grazie ai colleghi del laboratorio 121, Ana I, Isabel y Celia, sempre disponibili a prestare un reattivo o darte il protocollo di un esperimento. A Ana O., per essere aperta e spontanea. A Nacho, il mio collega di esperimenti, con cui ho condiviso gioie, dolori e molte risate. Che ti vada tutto stupendamente laddove sei andato. E grazie al capo del laboratorio, Esteban Domingo, per le riunioni scientifiche dalle quali scaturivano sempre nuove idee.

Grazie ai colleghi della sala di colture, perché grazie a loro il P2 virus é un posto dove si sta con piacere. In particolare, a Mari Angel e Nuncia, che ogni giorno fanno i loro mille compiti e hanno sempre un momento per chiederti come sta, a Mercedes, che ci da buoni consigli, a Bruno e Rocío, per il loro buon umore contagioso. Grazie a la gente del laboratorio 205, nostri vicini di cabina, a chi se ne é andato: Mila, Vero, Pablo e a chi é ancora tra di noi : Silvia, Alicia...

Grazie alle ragazze del INIA, a Esther, a Ana e Nereida per la loro simpatia e empatia, per aver fatto in modo che i congressi fossero un'esperienza divertente e per gli passeggiate fuori dal centro di lavoro. Grazie a Juan Carlos Saiz, per il suo buon umore e per il saper scegliere così bene il suo personale.

Grazie alla mia famiglia, che mi ha appoggiato da vicino e da lontano, credendo in me incondizionatamente. Grazie mille ai miei genitori, Caterina e Francesco, non starei qui senza di voi e ai miei fratelli, Paola e Giuseppe, per l'accettarmi e il volermi bene per quello che sono.

Grazie alla mia "nuova" famiglia: Jaime, il mio compagno di vita, che si prende costantemente cura di me, mi cpisce e cammina ogni giorno al mio fianco e a te, Adrián, mio piccolo grande miracolo, per riempire di significato ogni attimo della mia vita.

*No amount of experimentation can ever prove me right;
a single experiment can prove me I wrong*

.....*Albert Einstein*

RESUMEN

El virus de la Fiebre Aftosa (VFA) es el agente etiológico de una enfermedad altamente contagiosa que afecta numerosas especies de importancia ganadera. Se trata de un virus sin envuelta que pertenece a la familia *Picornaviridae* (genero aftovirus). El genoma de VFA consiste EN una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva y se encuentra incluido en una cápsida proteica de morfología icosaédrica constituida por 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales (VP1-VP2-VP3-VP4). Cinco protómeros constituyen un pentámero, la unidad fundamental de ensamblaje y desensamblaje de la cápsida. El pH de los endosomas celulares provoca la disociación de la cápsida en las subunidades pentaméricas, permitiendo la liberación del genoma viral. Como consecuencia de este mecanismo de penetración en las células, la cápsida de VFA es extremadamente sensible a pH ácido.

Con el objetivo de analizar las bases moleculares que regulan la disociación de la cápsida de VFA inducida por pH ácido, se ha aislado y caracterizado una batería de nuevos mutantes de VFA con resistencia diferencial a pH ácido. Las sustituciones aminoacídicas que alteran la estabilidad se distribuyeron preferencialmente en dos diferentes regiones de la cápsida: el extremo N-terminal de VP1 y la interfaz pentamérica. Además, el fenotipo de labilidad a pH ácido inducido por una mutación localizada en la interfaz pentamérica (VP3 A116V) fue compensado con la introducción de una sustitución localizada en extremo N-terminal de VP1 (VP1 N17D), generando el mutante doble VP3 A116V VP1 N17D. Estos resultados indican que la estabilidad del virión es el producto de la interacción de residuos de diferentes proteínas de la cápsida, y en particular los localizados en el N-terminal de VP1 o cerca de la interfaz pentamérica.

Debido a su mecanismo de desencapsidación, la replicación de VFA es inhibida por compuestos que bloquean la acidificación endosomal, como NH_4Cl y Con A, existiendo una correlación entre los niveles de resistencia a NH_4Cl y la labilidad a pH ácido de la cápsida de VFA. Sin embargo, esta correlación se perdió en el mutante VP3 A116V VP1 N17D, ya que a pesar de tener la misma sensibilidad a pH ácido que el virus parental, las poblaciones de este mutante fueron más resistente a NH_4Cl , sin apreciarse, mediante secuenciación convencional, la imposición de variantes. Los resultados obtenidos sugieren que este fenotipo se debe a que la presencia de las mutaciones VP3 A116V y VP1 N17D incrementa la plasticidad de la cápsida de VFA, haciéndola más tolerante a otros cambios de aminoácido y por lo tanto más propensa del virus parental a seleccionar fenotipos de resistencia a NH_4Cl .

Se ha descrito que la sustitución VP1 N17D, localizada en el N-terminal de VP1, incrementa la resistencia a pH ácido del virión de VFA. A partir del mutante VP1 N17D, se ha aislado un virus con una resistencia a pH ácido aún mayor que contiene una sustitución adicional (VP2 H145Y). Este mutante de VFA denominado VP2 H145Y VP1 N17D produjo viriones más estables a pH ácido, que también mostraron mayor estabilidad térmica (a 4 °C, la temperatura de almacenamiento de las vacunas inactivadas de VFA). Puesto que el almacenamiento prolongado a 4 °C o rupturas de la cadena de frío provocan la disociación de los viriones contenidos en las preparaciones de vacunas inactivadas químicamente, comprometiendo su inmunogenicidad, se procedió a evaluar la inmunogenicidad de una vacuna inactivada basada en este mutante en un hospedador natural: el cerdo. Los resultados obtenidos apoyan un posible uso de los mutantes de VFA con estabilidad a pH ácido incrementada como alternativas vacunales al virus parental.

Finalmente, con el objetivo de profundizar en el mecanismo de desencapsidación de los aftovirus, extendimos el estudio de los mecanismos que median la estabilidad de la cápsida al virus de la Rinitis Equina A (VREA), un aftovirus que provoca un cuadro respiratorio en caballos, genéticamente muy relacionado con VFA y cuya desencapsidación también se produce en los endosomas celulares inducida por pH ácido. Como fruto de este trabajo, se ha aislado una batería de mutantes con sensibilidad a pH ácido alterada, que difieren en su grado de inhibición mediada por acidificación endosomal. Curiosamente, todas las sustituciones encontradas en los mutantes resistentes y lábiles a pH ácido se localizaron en VP3, sugiriendo que esta proteína tiene un papel fundamental en el control de la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VREA. Además, todas estas sustituciones se localizaron en la interfaz intraprotomérica, entre VP3 y VP2 o entre VP3 y el extremo N-terminal de VP1. Estos resultados extienden nuestro conocimiento sobre las regiones que gobiernan la estabilidad a pH ácido de la cápsida de los aftovirus y se deberían tener en cuenta a la hora de usar VREA como modelo de aftovirus.

SUMMARY (RESUMEN EN INGLÉS)

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is the etiological agent of a highly contagious disease that affects important livestock species. FMDV is a small non-enveloped virus belonging to the Picornaviridae family (Aphthovirus genus). The FMDV genome, which consists of a positive RNA strand, is enclosed inside an icosahedral capsid built up with 60 copies of each of the four structural protein (VP1 to VP4). Five protomers associate in a pentamer, the smallest unit of assembly and disassembly of the capsid. The acidic pH inside cellular endosomes promotes the capsid dissociation in pentameric subunits and triggers virus uncoating and genome release. As a direct consequence of this mechanism of penetration in the cells, FMDV capsids are extremely sensitive to acidic pH.

We have analyzed the molecular basis of FMDV acid-induced disassembly by isolating and characterizing a panel of novel FMDV mutants differing in acid sensitivity. Amino acid replacements altering virion stability were preferentially distributed in two different regions of the capsid: the N terminus of VP1 and the pentameric interface. Even more, the acid labile phenotype induced by a mutation located at the pentameric interface in VP3 (VP3 A116V) could be compensated by introduction of an amino acid substitution in the N terminus of VP1 (VP1 N17D). These results indicated that virion stability is the fine-tuned product of the interaction between residues from different capsid proteins, in particular those located within the N terminus of VP1 or close to the pentameric interface.

As a consequence of its uncoating mechanism, FMDV infection is inhibited by drugs that block endosomal acidification such as NH₄Cl and Con A. Even more, there is a correlation between the levels of NH₄Cl resistance and the acid lability of the viral capsid. Nevertheless, the mutant VP3 A116V VP1 N17D, did not follow this correlation, because even having the same acid lability that the wildtype virus, since it was more resistant to NH₄Cl and showed the same acid lability. Our results suggest that the presence of the replacements VP3 A116V and VP1 N17D increases capsid plasticity, making it more tolerant to the introduction of other substitutions and therefore more prone to select NH₄Cl resistant phenotypes than the parental virus.

It has been previously reported that the substitution VP1 N17D, located in the N-terminus of VP1, increased acid resistance of FMDV virions. Using mutant VP1 N17D as a starting point, we isolated a virus with higher acid resistance carrying an additional replacement, VP2 H145Y, in a residue highly conserved among picornaviruses. The VP2 H145Y VP1 N17D virions also showed increased resistance to dissociation at 4 °C (the temperature for inactivated vaccine storage). Considering that long term storage at 4 °C or ruptures of the cold chain, provoke the dissociation of virions, reducing the immunogenicity of the vaccine, we have evaluated the immunogenicity in swine (a natural FMDV host) of a chemically inactivated vaccine based on this mutant. The presence of these amino acid substitutions did not compromise the immunological potential of this vaccine, including its ability to elicit neutralizing antibodies. These results support the feasibility of this kind of mutants with increased capsid stability as suitable seeding virus for the development of improved FMDV vaccines.

Finally, in order to extend the study of the molecular basis of the uncoating mechanism of aphthoviruses, we included in our analysis the equine rhinitis A virus (ERAV), a picornavirus associated with respiratory disease in horses and genetically closely related to FMDV. As described for FMDV, current data support that acidic pH inside cellular endosomes triggers ERAV uncoating. Accordingly, we isolated a panel of ERAV mutants with altered acid sensitivity and that differed on their degree of sensitivity to the inhibition of endosome acidification. Remarkably, all amino acid substitutions found in acid-labile or acid-resistant ERAVs were located in the capsid protein VP3, indicating that this protein plays a pivotal role for the control of pH stability of the ERAV capsid. Moreover, all amino acid substitutions mapped at the intraprotomer interface between VP3 and VP2 or between VP3 and the N terminus of VP1. These results expand our knowledge on the regions that regulate the acid stability of aphthovirus capsid and should be taken into account when using ERAV as a surrogate of FMDV.

| | |
|---|-----------|
| 4.5.2.3 Neutralización de virus mediante anticuerpos monoclonales | 33 |
| 4.6 Clonajes moleculares | 33 |
| 4.7 Transcripción <i>in vitro</i> de plásmidos..... | 38 |
| 4.8 Transfeccion de RNA viral..... | 38 |
| 4.9 Aislamiento de mutantes de VFA y VREA..... | 38 |
| 4.9.1 Clonajes biológicos | 39 |
| 4.9.1.1 Aislamiento de un mutante de VFA con resistencia a pH ácido incrementada (mutante sr1)39 | |
| 4.9.1.2 Aislamiento de mutantes de VFA de serotipo O resistentes a NH ₄ Cl..... | 39 |
| 4.9.1.3 Aislamiento de mutantes de VREA resistentes a NH ₄ Cl | 39 |
| 4.9.2 Pases seriados | 40 |
| 4.9.2.1 Selección de mutantes de VFA mediante pases en presencia de NH ₄ Cl | 40 |
| 4.9.2.2 Selección de mutantes de VREA previo tratamiento con pH ácido | 40 |
| 4.10 Amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos | 41 |
| 4.10.1 Extracción de RNA vírico | 41 |
| 4.10.2 Obtención de cDNA y su amplificación por RT-PCR..... | 41 |
| 4.10.3 Purificación y cuantificación de productos de PCR..... | 42 |
| 4.10.4 Secuenciación de DNA | 42 |
| 4.10.5 Cuantificación de moléculas de RNA vírico mediante RT-PCR en tiempo real | 42 |
| 4.11 Experimentos de competición viral | 42 |
| 4.12 Purificación de partículas de VFA..... | 43 |
| 4.13 Determinación de la sensibilidad diferencial a pH ácido | 43 |
| 4.13.1 Ensayo de disociación | 43 |
| 4.13.2 Ensayo de inactivación | 43 |
| 4.14 Métodos usados para de detección de proteínas virales en muestras de VFA purificado | 44 |
| 4.14.1 <i>Western blot</i> | 44 |
| 4.14.2 <i>Dot blot</i> | 44 |
| 4.14.2.1 Análisis de la especificidad antigénica de mutante de VFA | 45 |
| 4.15 Obtención de células dendríticas porcinas | 45 |
| 4.15.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) | 45 |
| 4.15.2 Enriquecimiento en células dendríticas plasmacitoides (pCDs)..... | 46 |
| 4.16 Infección y estimulación de las células dendríticas porcinas..... | 46 |
| 4.17 Detección de IFN-α en sobrenadantes..... | 47 |
| 4.18 Citometría de flujo | 47 |
| 4.19 Vacunación de cerdos con partículas inactivadas de VFA | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.19.1 Propagación de los virus, inactivación con BEI, concentración de las partículas de VFA | 48 |
| 4.19.2 Inmunización de animales y recogida de muestras de sangre | 48 |
| 4.19.3 Seroneutralización | 49 |
| 4.19.4 Detección de anticuerpos específicos contra VFA | 49 |
| 4.19.4.1 Anticuerpos específicos totales..... | 49 |
| 4.19.4.2 Isotipado de los anticuerpos frente a VFA | 50 |
| 4.20 Métodos estadísticos y análisis de datos | 50 |
| 4.21 Análisis estructurales de cápsidas víricas y modelado molecular..... | 51 |
| 4.22 Disoluciones y tampones | 51 |
| 5. Resultados | 53 |
| 5.1 Estudio del efecto combinado de mutaciones que confieren sensibilidades diferentes a pH ácido | 53 |
| 5.1.1 La labilidad a pH ácido conferida por mutaciones en la región interpentamérica de C-S8c1 puede ser compensada por una sustitución en el extremo N- terminal de VP1 | 53 |
| 5.1.2 Selección y caracterización de variantes de VFA con la cápsida más lábil mediante tratamiento con NH ₄ Cl | 56 |
| 5.1.3 Las mutaciones de adaptación a NH ₄ Cl seleccionadas en las diferentes variantes de C-S8c1 se localizan en la interfaz interpentamérica o en el extremo N-terminal de VP1 | 59 |
| 5.1.4 Mutaciones en VP3 y en el extremo N-terminal de VP1 modulan la resistencia a pH ácido de VFA de tipo O..... | 60 |
| 5.2 Análisis de la resistencia a NH₄Cl de C-S8c1 del mutante VP3 A116V VP1 N17D derivado del virus C-S8c1 | 63 |
| 5.2.1 El mutante VP3 A116V VP1 N17D se comporta como un virus resistente a NH ₄ Cl..... | 63 |
| 5.2.2 La resistencia a NH ₄ Cl del mutante VP3 A116V VP1 N17D radica en cambios en la población viral en respuesta al tratamiento con NH ₄ Cl | 64 |
| 5.2.3 Efecto de la multiplicidad de infección en la resistencia a NH ₄ Cl del virus C-S8c1 y del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D..... | 66 |
| 5.2.4 La frecuencia de selección de placas resistentes a NH ₄ Cl es más alta para el doble mutante VP3 A116V VP1 N17D que para el virus parental | 67 |
| 5.2.5 Evaluación de la resistencia del mutante VP3 A116V VP1 N17D frente a otros compuestos..... | 68 |
| 5.2.6 El mutante VP3 A116V VP1 N17D presenta una capacidad replicativa (<i>fitness</i>) incrementada con respecto a C-S8c1 y se adapta a NH ₄ Cl adquiriendo mutaciones ventajosas. | 69 |
| 5.3 Aislamiento y caracterización de un mutante de VFA resistente a pH ácido: el mutante sr1 | 72 |

| | |
|--|------------|
| 5.3.1 Aislamiento del mutante sr1 | 72 |
| 5.3.2 El mutante sr1 es más sensible a drogas que aumentan el pH endosomal que los virus C-S8c1 y m6..... | 73 |
| 5.3.3 Análisis de las mutaciones en la cápsida seleccionadas en el mutante sr1 | 74 |
| 5.3.4 Las sustituciones VP1 N17D y VP2 H145Y son responsables del incremento en la resistencia a pH ácido de la cápsida del virus sr1 | 75 |
| 5.3.5 Efecto de las mutaciones VP2 H145Y VP1 N17D en la disociación de la cápsida viral tras tratamiento con pH ácido..... | 76 |
| 5.3.6 Los viriones de los mutante sr1 y m6 presentan una estabilidad incrementada 4 °C con respecto a los de C-S8c1 | 78 |
| 5.3.7 Análisis del procesamiento del precursor VP0 en los viriones del virus sr1 | 80 |
| 5.3.8 Infectividad específica de las poblaciones virales C-S8c1 y sr1 | 80 |
| 5.3.9 Progresión de la infección del mutante sr1 en poblaciones de PBMC enriquecidas en células dendríticas plasmacitoides | 81 |
| 5.3.10 Análisis del potencial inmunogénico del virus sr1 | 84 |
| 5.3.10.1 Las mutaciones VP2 H145Y y VP1 N17D no alteran la antigenicidad de los viriones..... | 84 |
| 5.3.9.2 Análisis de la respuesta humoral inducida en cerdos tras inmunización con C-S8c1 y el mutante sr1 inactivados químicamente..... | 85 |
| 5.4 Selección de mutantes de VREA con sensibilidad diferencial a pH ácido | 89 |
| 5.4.1 Aislamiento y caracterización de VREA mutantes resistentes a NH ₄ Cl..... | 89 |
| 5.4.2 Selección y caracterización de mutantes de VREA con resistencia a pH ácido incrementada | 90 |
| 5.4.3 Bases moleculares de la sensibilidad a pH ácido de los mutantes de VREA seleccionados..... | 91 |
| 5.4.4 <i>Fitness</i> de los mutantes de VREA con sensibilidad alterada a pH ácido | 94 |
| 6. Discusión..... | 97 |
| 6.1 Análisis de las mutaciones que alteran la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VFA..... | 97 |
| 6.1.1 La región interpentamérica y el N-terminal de VP1 modulan la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VFA..... | 98 |
| 6.1.2 Resistencia a NH ₄ Cl del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D..... | 102 |
| 6.1.3 La mutación VP2 H145Y incrementa la resistencia a pH ácido del mutante m6 | 105 |
| 6.2 Potencial del virus sr1 como alternativa vacunal | 106 |
| 6.2.1 Estabilidad térmica y <i>fitness</i> de los mutante m6 y sr1..... | 106 |
| 6.2.2 Interacción del mutante sr1 con células dendríticas plasmacitoides..... | 108 |
| 6.2.3 Potencial inmunogénico de una vacuna inactivada basada en el mutante sr1..... | 109 |
| 6.3 Análisis de mutantes de VREA con diferentes grados de sensibilidad a pH ácido..... | 111 |

| | |
|------------------------------|------------|
| 7. Conclusiones | 115 |
| 8. Bibliografía..... | 117 |
| 9. Anexo | 131 |

1. Abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| ANOVA | análisis de la varianza (<i>ANalysis Of VAriance</i>) |
| BEA | 2-bromoetilamina hidrobromuro |
| BEI | etilenimina binaria (<i>Binary Ethylenimine</i>) |
| BHK | línea celular derivada de riñón de hámster (<i>Baby Hámster Kidney</i>) |
| BSA | seroalbúmina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>) |
| CAP | CAPeruza (modificación post-transcripcional que suben los RNA mensajeros celulares) |
| CBMSO | Centro de Biología Molecular Severo Ochoa |
| CD | célula dendrítica |
| cCD | célula dendrítica convencional |
| cDNA | ácido desoxirribonucleico complementario (<i>Complementary DeoxyriboNucleic Acid</i>) |
| CHO | línea celular derivada de ovario de hámster (<i>Chinese Hámster Ovary</i>) |
| Con A | concanamicina A |
| Da | Dalton |
| DEPC | dietilpirocarbonato |
| DMEM | medio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucleico (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>) |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | ácido etilén diamino tetraacético |
| eIF4G | factor de transcripción eucariótico 4G (<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G</i>) |
| ELISA | ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) |
| FA | fiebre aftosa |
| g | valor de aceleración de la gravedad |
| GTP | guanosina trifosfato |
| GTPasa | guanosin trifosfatasas |
| GuHCl | cloruro de guanidinio (<i>guanidine hydrochloride</i>) |
| h | hora |
| HEPES | ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina etanosulfónico |

ABREVIATURAS

| | |
|------------|---|
| HS | heparán sulfato |
| IFN | interferón |
| IPTG | isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido |
| LB | medio de Luria (<i>Luria Broth</i>) |
| Ig | inmunoglobulina |
| Kb | kilobase |
| MACS | <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> |
| m.d.i. | multiplicidad de infección |
| min | minuto |
| Nf-kB | factor nuclear kappa B (<i>Nuclear Factor kappa B</i>) |
| N-Terminal | amino-terminal |
| OIE | Organización Mundial de la Sanidad Animal (Oficina Internacional de Epizootias) |
| p | p-valor |
| PAMP | patrón molecular asociado a patógeno (<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>) |
| PBMC | célula mononuclear de sangre periférica (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>) |
| PBS | tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>) |
| pCD | célula dendrítica plasmacitoide |
| PCR | reacción a cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PDB | base de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>) |
| poliA | poliadenilato |
| poliC | polirribocitidilato |
| p.i. | post-infección |
| PFA | paraformaldehído |
| PRR | receptor de reconocimiento de patrones (<i>Pattern Recognition Receptor</i>) |
| p.v. | post-vacunación |
| Rab | <i>Ras related protein in Brain</i> |
| RNA | ácido ribonucleico (<i>RiboNucleic Acid</i>) |
| RT | transcripción inversa (<i>RetroTranscription</i>) |
| S | Svedberg |
| SDS | dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>) |
| SFB | suero fetal bovino |

| | |
|----------|--|
| t.a. | temperatura ambiente |
| TCID | Dosis infectiva en cultivos de tejido (<i>Tissue Culture Infective Dose</i>) |
| TNE | tampón Tris-NaCl-EDTA |
| UFP | unidad formadora de placa (<i>Plaque Forming Unit</i>) |
| UTR | región no codificante (<i>Untranslated Region</i>) |
| V-ATPasa | adenosina trifosfatasa vacuolar (<i>Vacuolar AdenosinTriPhosphatASE</i>) |
| Vero | célula epitelial de riñón de mono verde africano |
| VFA | virus de la fiebre aftosa (<i>Foot and mouth disease virus</i>) |
| VREA | virus de la rinitis equina (<i>Equine rhinitis A virus</i>) |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido |

Códigos de una y tres letras para los aminoácidos

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

2. Introducción

2. 1 La fiebre aftosa

La fiebre aftosa (FA) o 'glosopeda' es una enfermedad vírica que afecta a animales rumiantes ungulados, incluyendo especies de notable importancia ganadera como vacas, ovejas, cerdos y cabras (Jamal y Belsham, 2013). El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la fiebre aftosa (VFA), un patógeno transmisible por contacto directo, transporte mecánico, aerosoles, etc., que puede ser transportado por el viento a larga distancia (Ferguson *et al.*, 2001; Pereira, 1981).

El VFA replica en primera instancia en tejidos epiteliales generando lesiones cutáneas (denominadas aftas) en el morro, lengua y patas del animal. Entre las 24-48 horas tras la infección, el virus invade el torrente sanguíneo, difundiéndose a diferentes órganos y tejidos provocando fiebre y viremia. Tras esta fase aguda de la infección, que suele durar una semana, los signos clínicos gradualmente desaparecen en concomitancia con la aparición de una fuerte respuesta inmunitaria (Bachrach, 1977). El virus puede permanecer de forma asintomática y persistente en bovinos, lo que supone un problema que puede complicar el control de la enfermedad, existiendo estudios epidemiológicos que apoyan la hipótesis de que animales portadores asintomáticos (*carriers*) puedan provocar nuevos brotes por el contacto con animales susceptibles a la enfermedad (Sobrino *et al.*, 2001). A pesar de su baja mortalidad, la FA se considera la enfermedad de mayor importancia en la Sanidad Animal mundial, lo que la convierte en una enfermedad infecciosa de declaración obligatoria a la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE, 2015b). Las razones que justifican esta importancia son principalmente económicas ya que cada nuevo brote puede ocasionar pérdidas comerciales enormes, sobre todo para los grandes exportadores de ganado vivo o carne, provocando el sacrificio o cuarentena del ganado infectado o en riesgo de infección y el cierre de los mercados ganaderos y de productos relacionados.

Actualmente, la enfermedad es endémica en partes de Asia, África Subsahariana, Oriente Medio, América del Sur y Europa del Este. En los últimos años se han registrado brotes en países o regiones que se consideraban libres de la enfermedad como es el caso de Reino Unido (Sobrino, 2004), Japón y Corea del Sur (Brito *et al.*, 2015), lo que pone en evidencia el riesgo actual de esta enfermedad para la Sanidad Animal.

INTRODUCCIÓN

2.2 El virus de la fiebre aftosa

2.2.1 Clasificación

El VFA pertenece a la familia *Picornaviridae* (www.ictvonline.org) que se compone de cinco géneros: enterovirus, rinovirus, cardiovirus, hepatovirus y aftovirus. VFA es el prototipo del género aftovirus (Fauquet, 2005), en el que recientemente se ha incluido el virus de la rinitis equina A (VREA) por la semejanza de propiedades fisicoquímicas, estructurales y de su secuencia nucleotídica con las de VFA (Li *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1973)(apartado 2.3). Esta Tesis Doctoral, se ha centrado en el estudio de los mecanismos de entrada de los aftovirus VFA y VREA.

El VFA posee un genoma RNA de cadena simple y polaridad positiva, carece de envuelta, y presenta una cápsida proteica de simetría icosaédrica (Belsham, 1993; Domingo, 1990; Sobrino *et al.*, 2001). El VFA fue el primer virus animal identificado cuando en el 1898, Loeffler y Frosch demostraron que el causante de la FA era un agente infeccioso filtrable más pequeño que una bacteria (Domingo, 1990). Desde entonces se han descrito siete serotipos distintos de este virus (A, O, C, Asia-1, SAT1, SAT2, SAT3) y múltiples subtipos (Domingo, 1990).

2.2.2 Cuasiespecies víricas

Las poblaciones de los virus que tienen como material genético RNA, entre los que se incluye el VFA, están compuestas por distribuciones complejas de variantes distintas pero estrechamente relacionadas entre sí, que se denominan cuasiespecies víricas. En las cuasiespecies no existe un genoma definido, hablándose de un genoma consenso constituido por el promedio de variantes (Domingo, 2000). Dentro de las cuasiespecies existe un equilibrio entre una alta tasa de mutación, inherente a la replicación del RNA, y una continua competición reflejada en el mantenimiento de la eficacia biológica (*fitness*). Esta estructura confiere una enorme variabilidad genética (Domingo, 1990; Domingo *et al.*, 2003), una gran flexibilidad adaptativa (Domingo *et al.*, 1997) y una continua capacidad de evolución fenotípica a los virus RNA. Para el VFA, existen distintos ejemplos de cambios fenotípicos notables derivados de cambios genéticos mínimos, incluyendo mutaciones puntuales, como la adquisición de resistencia a anticuerpos monoclonales (Lea *et al.*, 1994), fármacos (Ferrer-Orta *et al.*, 2010; Sierra *et al.*, 2007), el escape a vacunas peptídicas (Taboga *et al.*, 1997), cambios en el rango de hospedador (Nuñez *et al.*, 2001), o alteraciones de las propiedades físico-químicas de la cápsida como estabilidad frente a pH (Liang *et al.*, 2014; Martín-Acebes *et al.*, 2010; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Twomey *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2014) o temperatura (Mateo *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2014).

2.2.3 Organización genómica y proteínas víricas

El material genético de VFA está compuesto por una única molécula de RNA de polaridad positiva, que tiene una longitud de unas 8.2 Kb. En el caso del aislado de VFA empleado en esta Tesis Doctoral, C-S8c1, la longitud de su RNA es de 8115 nucleótidos (AJ133357.1), sin tener en cuenta los tramos homopoliméricos de polirribocitidilato (poliC) y poliadenilato (poliA), que son heterogéneos en longitud (Escarmis *et al.*, 1996; Escarmis *et al.*, 1992; Toja *et al.*, 1999). El RNA viral contiene una única fase de lectura abierta (ORF) que está flanqueada por dos regiones no codificantes altamente estructuradas, denominadas 5' *untranslated región* (UTR) y 3'UTR (Fig.1), involucradas en la replicación y traducción virales (Bigeriego *et al.*, 1999; Sáiz *et al.*, 2001). La región 5'UTR contiene diversos elementos estructurales como el fragmento S, poliC, *pseudo-knots*, un elemento replicativo que actúa en *cis* (*cre*) y el sitio de entrada del ribosoma (IRES), responsable de la traducción del RNA independiente de forma independiente de CAP (Fernandez-Miragall *et al.*, 2009; Martínez-Salas, 2008). La región 3'UTR contiene dos *stem loops* denominados SL1 y SL2 (Fig.1), seguidos de un tramo de poliA, típico de RNA mensajeros celulares (Martínez-Salas *et al.*, 2008). La traducción del RNA de VFA se inicia a partir de dos tripletes AUG localizados después del IRES y separados entre sí por 84 nucleótidos, siendo el segundo el más utilizado (Andreev *et al.*, 2007; Belsham, 1992; López de Quinto y Martínez-Salas, 1998). A medida que la poliproteína es traducida se generan los distintos precursores y proteínas maduras, mediante procesamiento proteolítico que llevan a cabo proteasas virales. El ORF codifica una única poliproteína que puede dividirse en 4 regiones denominadas: L, P1, P2 y P3 (Fig. 1).

La región L codifica dos proteínas solapadas denominadas L_{ab} y L_b, resultado del inicio de la traducción en cada uno de los tripletes AUG funcionales del genoma viral. Se trata de proteasas que actúan tanto en el procesamiento de la poliproteína viral, siendo responsables del corte entre L y P1 (Medina *et al.*, 1993), como en el corte del factor de traducción celular eIF4G (Devaney *et al.*, 1988), que origina el cese de la traducción de mRNA celulares dependiente de CAP. Asimismo, la proteína L corta factores celulares implicados en la respuesta de interferón (IFN) de tipo I (apartado 2.2.5.2). La región P1 codifica las proteínas estructurales que constituyen la cápsida viral (apartado 2.2.4). La región P2 codifica las proteínas no estructurales 2A, 2B y 2C. El péptido 2A cataliza en *cis* la separación de P1-2A de 2BC (Ryan *et al.*, 1991), siendo este proceso el resultado de un salto en la traducción de la poliproteína originado por un proceso de parada y reiniciación del ribosoma (Tulloch, 2017). Las proteínas maduras 2B y 2C y su precursor 2BC participan en la formación de las vesículas

INTRODUCCIÓN

citoplasmáticas sobre las que se organiza el complejo de replicación del virus, e inhiben la secreción de proteínas celulares (García-Briones *et al.*, 2006; Moffat *et al.*, 2007).

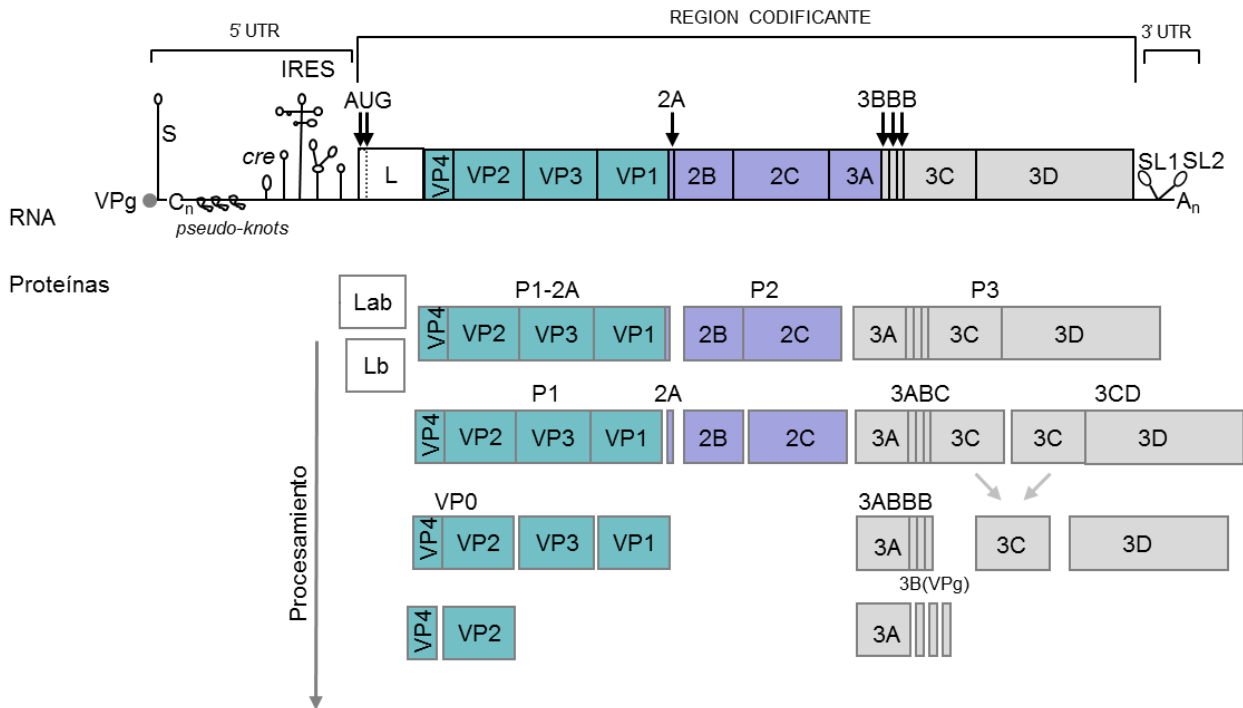


Figura 1. Organización genómica de VFA y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral. El esquema de la parte superior muestra la organización genómica de la molécula de RNA de VFA, indicando la localización de la región codificante (representada por cajas) flanqueada por las dos regiones no codificantes 5' UTR y 3' UTR, con la proteína 3B (VPg) covalentemente unida al extremo 5'. Cn y An indican los tramos de poliC y poliA, respectivamente. En la parte inferior, el esquema representa el procesamiento proteolítico de la poliproteína para dar lugar a los diferentes precursores y proteínas maduras. Los colores hacen referencia a las 4 regiones en las que se divide la poliproteína: la región leader (L) en blanco, la región P1 en azul, la región P2 en morado y la región P3 en gris. Para una explicación detallada, consultar el texto. Modificado de Martín-Acebes, 2009.

La región P3 codifica las proteínas maduras 3A, 3B, 3Cpro y 3Dpol. La proteína 3A juega papeles importantes en replicación, virulencia y rango de hospedador (Doedens y Kirkegaard, 1995; Giraudo *et al.*, 1990; Gonzalez-Magaldi *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 1998). El VFA codifica tres copias no idénticas en tándem de la proteína 3B (también denominada VPg). VPg se uridila y se une covalentemente al extremo 5' del RNA genómico del virus, participando en la iniciación de la síntesis del RNA y probablemente también en encapsidación (Jiang *et al.*, 2014; Nayak *et al.*, 2005). 3Cpro es una proteasa que cataliza la mayoría de las escisiones proteolíticas de la poliproteína (Vakharia *et al.*, 1987), cuya estructura tridimensional se ha resuelto mediante cristalografía a rayos X (Birtley *et al.*, 2005). 3Dpol es la RNA polimerasa dependiente de RNA encargada de la replicación del genoma de VFA, tanto de la cadena positiva como de la negativa del RNA. 3Dpol cataliza también la uridilación

del péptido 3B, para que éste actúe como iniciador de la síntesis de RNA de polaridad positiva (Paul, 2002). Su estructura cristalográfica también ha sido resuelta (Ferrer-Orta *et al.*, 2010). La baja fidelidad de copia que presenta la RNA polimerasa es importante para la dinámica poblacional del virus (apartado 2.2.2).

2.2.4 Estructura de la cápsida: proteínas y sitios antigénicos

La cápsida de VFA está formada por 60 copias de cada una de las proteínas estructurales VP1 (1C), VP2 (1B), VP3 (1D) y VP4 (1A). Se ha resuelto mediante cristalografía de rayos X la estructura tridimensional a nivel atómico de las cápsidas correspondientes a diferentes tipos de VFA, entre ellas la de los aislados O₁BFS y O₁K (serotipo O) (Acharya *et al.*, 1989; Fry *et al.*, 1999), A22 y A10 (serotipo A) (Curry *et al.*, 1996; Curry *et al.*, 1997; Fry *et al.*, 2005) y C-S8c1 (serotipo C) (Lea *et al.*, 1994), el virus utilizado en esta Tesis Doctoral.

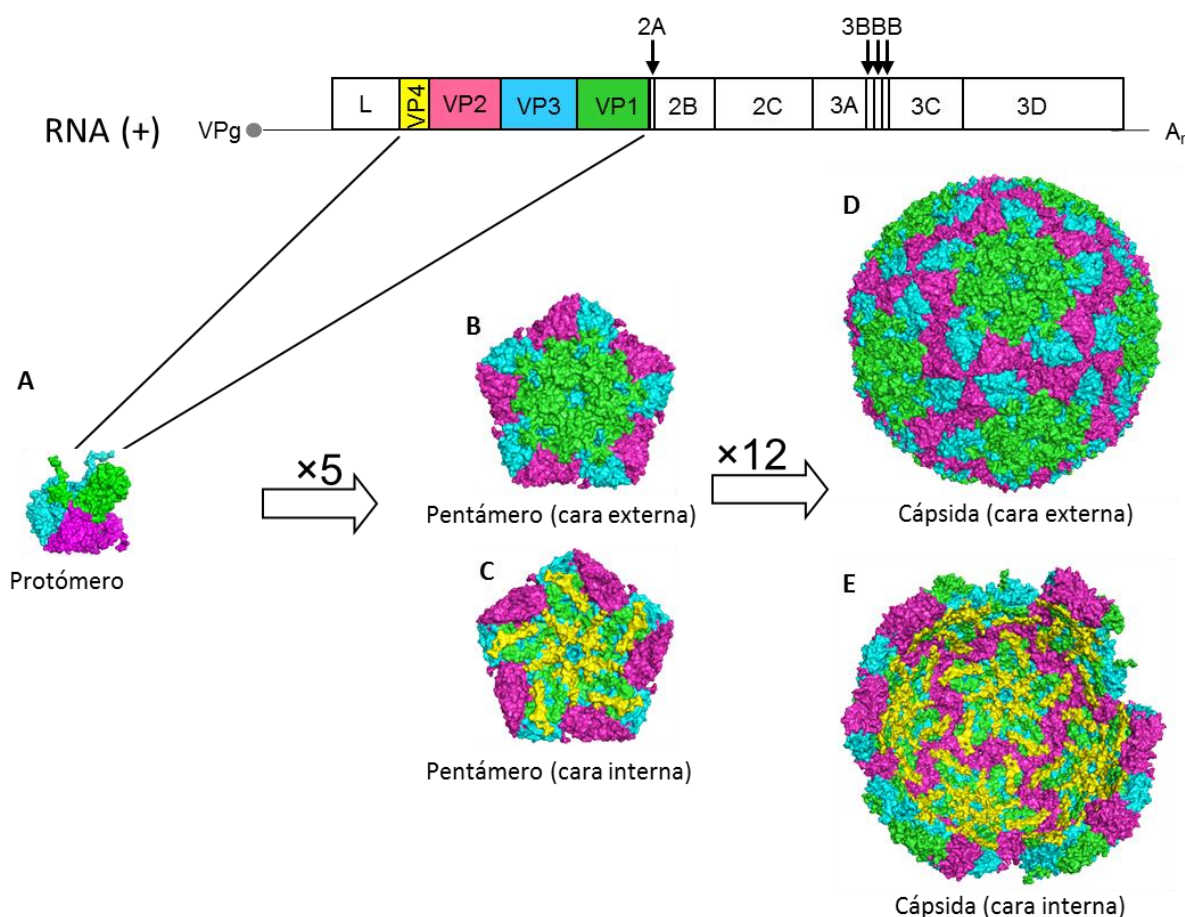


Figura 2. Proteínas estructurales y ensamblaje de la cápsida. En la parte superior se representa la molécula de RNA viral de VFA unida a la molécula de VPg en el extremo 5' y con el poliA (A_n) en el extremo 3'. Dentro de la región codificante se representan en cajas las proteínas estructurales VP1 (en verde), VP2 (en magenta), VP3 (en cian) y VP4 (en amarillo). En la parte inferior se esquematiza como la unión de una copia de cada proteína origina un protómero (A), 5 protómeros se unen a formar un pentámero (B y C) y 12 pentámeros forman una cápsida (D y E). Las estructuras mostradas se basan en las coordenadas atómicas de la cápsida del aislado C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994). La representación de la superficie de la estructura se realizó con el programa informático PyMol. Adaptado de Martin-Acebes, 2009.

INTRODUCCIÓN

En general existe una considerable similitud estructural entre aislados virales. Se trata de una cápsida con simetría icosaédrica y un diámetro alrededor de 30 nm. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 (23-24 kDa) constituyen la superficie externa de la cápsida y comparten una estructura en barril β compuesta por 8 cadenas antiparalelas conectadas entre sí por bucles. Las estructuras terciarias de las proteínas VP1-3 en las cápsidas de otros picornavirus (Hogle *et al.*, 1985; Luo *et al.*, 1987; Rossmann *et al.*, 1985) mantienen por lo general este mismo patrón (Acharya *et al.*, 1989). La proteína VP4 (9 kDa) se localiza en la cara interna de la cápsida y está unida covalentemente en su extremo N-terminal a un residuo de ácido mirístico (Belsham *et al.*, 1991). La proteína VP4 madura es el resultado del procesamiento proteolítico del precursor VP0 en VP2+VP4, que se produce una vez ensamblada la cápsida (apartado 2.5.3).

La primera unidad de ensamblaje de la cápsida viral es el protómero biológico (Fig. 2A), que tiene un coeficiente de sedimentación de 5 S y está formado por una copia de cada una de las cuatro proteínas estructurales. Cinco protómeros se ensamblan dando lugar a un pentámero (Fig. 2B y C), de coeficiente de sedimentación 12 S. Las subunidades pentaméricas constituyen los intermedios de ensamblaje y desensamblaje de la capsida de VFA. Doce pentámeros se asocian y forman la cápsida (Fig. 2D y 2E). La cápsida completa junto con la molécula de RNA tiene un coeficiente de sedimentación de 140 S.

En cada eje de simetría quíntica se localiza un poro hidrofóbico. En la base de este poro se encuentran los extremos N-terminales de VP4, cada uno conteniendo una molécula de ácido mirístico. La presencia de este poro explica la rápida penetración de iones Cs^+ y la mayor densidad del VFA en gradientes de CsCl en comparación con otros picornavirus (Acharya *et al.*, 1989). Otra característica que diferencia VFA de otros picornavirus es el bucle G-H de VP1. Se trata de uno de los numerosos bucles que sobresalen de la cápsida y que conectan las láminas β entre ellas. En general, estos bucles difieren mucho en estructura y secuencia entre los diferentes géneros de picornavirus y en los diferentes serotipo de VFA, y, siendo muy inmunogénicos, definen el carácter antigénico de estos virus. El bucle G-H de VFA, comprendido entre las posiciones 138-150 de la proteína VP1 (Lea *et al.*, 1994), es flexible y en su posición central se localiza un triplete Arg Gly Asp (RGD), altamente conservado, que mimetiza la secuencia de interacción de algunos ligandos celulares con moléculas de la familia de las integrinas (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984; Takada *et al.*, 2007). 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 *et al.*, 2007). Mediante

ensayos de competición con péptidos que contenían la secuencia RGD se comprobó el papel funcional de este motivo como ligando viral de unión a receptores celulares (Baxt y Becker, 1990; Fox *et al.*, 1989; Mateu *et al.*, 1996). Además de contener el sitio de unión al receptor para la entrada del virus en la célula, el bucle G-H se encuentra altamente expuesto e induce una gran cantidad de anticuerpos neutralizantes en distintas especies, lo que lo convierte en un sitio antigénico principal compuesto por diferentes epítomos solapantes, denominado sitio A (Mateu *et al.*, 1990). La enorme variabilidad de los diferentes aislados y serotipos de VFA en este bucle tiene por lo tanto un claro significado evolutivo, así como lo tiene la conservación del triplete RGD, fundamental para el reconocimiento del receptor.

La identificación del bucle G-H de VP1 como sitio de unión al receptor de VFA se contrapone con la hipótesis del cañón, validada para otros picornavirus (Rossmann y Johnson, 1989), según la cual el sitio de unión al receptor se encuentra en una depresión inaccesible a los anticuerpos y que por esta razón permanece invariable (Hogle *et al.*, 1985; Luo *et al.*, 1987; Rossmann *et al.*, 1985).

Otros sitios antigénicos de la cápsida de VFA son los denominados sitio C, que se localiza en el extremo C-terminal de VP1 y es continuo e independiente del sitio A en C-S8c1 pero no en VFA de serotipo O (Parry *et al.*, 1990), y el sitio D, que es discontinuo y comprende residuos de VP1, VP3 y VP2 (Lea *et al.*, 1994; Mateu, 2017)

2.2.5 Vacunas y respuesta inmune

2.2.5.1 Vacunas en uso y sus limitaciones

La vacunación sistemática ha permitido erradicar la FA en numerosos países desarrollados. Este reto se ha alcanzado gracias al uso de vacunas basadas en viriones de VFA inactivados químicamente (Barteling y Cassim, 2004). El primer inactivante usado para la producción de vacunas contra VFA fue la formalina (Graves, 1963), con acción desnaturalizante sobre las proteínas virales. No obstante, con el curso de los años se vio que las cinéticas de inactivación de VFA y poliovirus con este compuesto no eran lineales, generándose un retardo al final de la reacción en zonas de concentración no medible con las técnicas tradicionales de control de inactivación (efecto cola) (Brown *et al.*, 1963; Gard, 1957), lo que dificultaba asegurar la completa inactivación del patógeno y producía, en ocasiones, escapes responsables de nuevos brotes (Bahnmann, 1990; Beck y Strohmaier, 1987). Por esta razón, la formalina fue progresivamente sustituida con la etilamina binaria (BEI), actualmente el único compuesto aprobado por la OIE por la inactivación de VFA con fines vacunales (OIE, 2015a). Se trata de un producto químico alquilante que actúa sobre el RNA preservando la estructura del virión y por

INTRODUCCIÓN

lo tanto su antigenicidad (Brown, 2001). Las formulaciones de las vacunas inactivadas convencionales incluyen adyuvantes, como $Al(OH)_3$ /saponina o formulaciones oleosas (Doel, 1999) y frecuentemente se incluye una mezcla de los diferentes serotipos de VFA circulantes en el área en el momento de la vacunación. Una de las limitaciones de este tipo de vacunas inactivadas es su inestabilidad a temperatura ambiente debido a la labilidad térmica del virión de VFA, que empieza a disociarse en sus subunidades pentámicas ya a temperaturas de 4 °C, y más rápidamente a temperaturas superiores, lo que disminuye notablemente su inmunogenicidad (Brown y Crick, 1959; Meloen *et al.*, 1979). Por lo tanto, las vacunas necesitan una larga y costosa cadena del frío desde el punto de su fabricación hasta el de su administración. Debido a las condiciones climatológicas y logísticas de muchos países en los que la enfermedad es endémica, se pueden producir rupturas de la cadena del frío que afectan a la eficacia de la vacuna. Asimismo, se necesitan instalaciones de biocontención durante el proceso de crecimiento del virus a gran escala para la producción de la vacuna, lo que aumenta el coste de las mismas. Por otro lado, a pesar de que el antígeno viral se purifica durante la producción de la vacuna, cabe la posibilidad que se incorporen proteínas no estructurales en la preparación que, en el caso de estar en concentración suficiente para inducir anticuerpos contra ellas, limitarían la validez de los test diagnósticos empleados para distinguir entre animales infectados y vacunados, los cuales se basan en la detección de estos mismos anticuerpos frente a proteínas no estructurales. Por estas razones, se sigue trabajando en diferentes direcciones para el desarrollo de nuevas vacunas frente a la FA, como, entre otras, las vacunas basadas en péptidos sintéticos (Cubillos *et al.*, 2008) y en cápsidas virales vacías (Grubman, 2005).

2.2.5.2 Respuesta inmune: células dendríticas e interferón

Las células dendríticas (CD) son un tipo de células especializadas característica del sistema inmunitario de los mamíferos. Son las principales células presentadoras de antígeno (APC) por su capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos de forma óptima a linfocitos T, y generar respuestas inmunes específicas (Iwasaki y Kelsall, 2000; Mejri y Brossard, 2007). Actuando como un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, estas células constituyen elementos claves en la respuesta contra el patógeno y por esta razón son una diana importante para cualquier vacuna (Kamble *et al.*, 2016; Obeid *et al.*, 2015). Las CD, como todas las células implicadas en la respuesta innata, reconocen los PAMP (*pathogen associated molecular patterns*) del patógeno través de su PRR (*pattern recognition receptors*) (Janeway, 1989). La detección de PAMP por diversos receptores activa la síntesis de citoquinas en las CD que promueven su maduración. Entre ellas, la citoquina sin

duda más estudiada por su potente actividad antiviral es el interferón (IFN) (Meunier y Broz, 2015). La familia de los interferones incluye dos tipos de citoquinas: IFN de tipo I (entre los que destacan los subtipos α , β) y el IFN de tipo II (subtipo γ) (Platanias, 2005).

Para entender la biología de las CD, hay que tener en cuenta que se trata de un tipo celular muy heterogéneo y en constante diferenciación. Un paso importante en su maduración, en términos de fenotipo y función, es la diferenciación desde células dendríticas plasmacitoides (pCD) a células dendríticas convencionales cCD (McCullough *et al.*, 2009). Mientras que la denominación de cCD se aplica a todos los subgrupos de células dendríticas con función de presentador de antígeno, las pCD son un grupo específico de CD inmaduras, con la única capacidad de producir grandes cantidades de IFN α en respuesta a infección viral (Liu, 2005; Swiecki y Colonna, 2015). También se denominan *natural interferon producing cells* (NIPC) (Fitzgerald-Bocarsly, 1993). A lo largo de esta Tesis Doctoral, se han usado pCD porcinas, directamente extraídas de la sangre del animal. En cerdos, así como en humanos, las pCD son las únicas células del sistema inmune que expresan TLR9 (Guzylack-Piriou *et al.*, 2004).

Las pCD producen IFN de tipo I en respuesta a un largo repertorio de virus DNA y RNA, la mayoría con envuelta (Feldman *et al.*, 1994; Fitzgerald-Bocarsly *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha observado que los virus sin envuelta, como adenovirus, poliovirus, virus del simio 40 o incluso VFA son débiles inductores de IFN- α en pCD (Feldman *et al.*, 1994; Guzylack-Piriou *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2000), comparados con los virus con envuelta. Se ha propuesto que esta diferencia podría estar relacionada con sus diferentes mecanismos de entrada y desencapsidación (Guzylack-Piriou *et al.*, 2006).

La actividad antiviral del IFN (de tipo I o II) no es específica y actúa sobre diferentes virus, aunque el efecto que provoca sobre cada uno de ellos es muy variable. En general, los virus RNA, comúnmente usados como indicadores de IFN, son altamente sensible a esta citoquinina (Solov'ev, 1973). El VFA no es una excepción y los efectos inhibitorios del IFN de tipo I sobre su replicación se han demostrado *in vivo*, en modelo de ratones y en cerdos, e *in vitro*, en diferentes líneas celulares (Kim *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2003; Rodríguez-Pulido *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que el IFN de tipo II es también necesario para el desarrollo de un estado antiviral en el hospedador (Kim *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2007). Por otro lado, el VFA ha desarrollado mecanismos de defensa que le permiten evadir la respuesta inmune innata e instaurar una infección productiva, entre ellos el provocar la degradación de NF- κ B, factor de transcripción importante para los genes del IFN- β , mecanismo mediado por la proteasa L (de Los Santos *et al.*, 2007; Grubman *et al.*, 2008).

INTRODUCCIÓN

En VFA, existe una buena correlación entre la protección conferida tras la inmunización con vacunas inactivadas o la infección viral y la inducción de niveles altos de anticuerpos circulantes neutralizantes. Esta inducción requiere que linfocitos B reconozcan epítomos en la partícula viral. Por otro lado, se ha descrito que el procesamiento de epítomos del virus por células presentadora de antígeno y su reconocimiento por linfocitos T CD4 son también importantes para una producción óptima de anticuerpos neutralizantes (Sobrino *et al.*, 2001). No obstante, existen animales inmunizados que resultan protegidos aun teniendo niveles bajos de anticuerpos neutralizantes (McCullough, 2004), habiéndose descrito que la opsonización por anticuerpos específicos, aunque no neutralizantes, podría favorecer la protección del animal (Lannes *et al.*, 2012). Se ha observado que la opsonización de VFA estimula la fagocitosis por parte de monocitos y macrófagos *in vitro* (McCullough *et al.*, 1988) y que la depleción de macrófagos en ratones vacunados disminuye sensiblemente los niveles de protección *in vivo* (Quattrocchi *et al.*, 2011). Por otro lado, las pCD, incapaces de inducir una respuesta en presencia solo de viriones solos, se activan cuando estos están opsonizados por IgG específicas (Lannes *et al.*, 2012). Se ha descrito que la estimulación de las pCD requiere que el VFA comience su ciclo replicativo (Guzylack-Piriou *et al.*, 2006). Sin embargo, esta puede considerarse una replicación abortiva ya que no se produce virus infeccioso y los niveles de expresión de los antígenos virales disminuyen a lo largo del tiempo (Bautista *et al.*, 2005; Harwood *et al.*, 2008). Dada la importancia de las CD en generar una respuesta antiviral eficaz, entender la naturaleza de la interacción entre estas células y VFA es fundamental para el desarrollo de vacunas contra este virus.

2.2.6 El ciclo de replicación viral

La interacción inicial de la partícula viral se produce con el receptor de superficie, moléculas de integrinas en hospedadores naturales. Las estimaciones indican que pueden unirse en torno a 10^3 a 10^4 partículas de VFA por célula (Baxt y Bachrach, 1980). Una vez unida al receptor, la partícula viral es internalizada mediante endocitosis. El virus es flexible en el uso de receptor pudiendo emplear receptores diferentes a las integrinas como el heparán sulfato (HS), en virus adaptados a cultivos celulares (Baranowski *et al.*, 2000; Sa-Carvalho *et al.*, 1997). Se ha descrito que aislados del VFA que utilizan integrinas como receptor entran en la célula por endocitosis mediada por clatrina (Martín-Acebes *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2005). En cambio, los virus que usan HS como receptor son internalizados por medio de caveolas (O'Donnell *et al.*, 2008). Recientemente, se ha descrito que aislados de VFA de tipo Asia 1 inducen reordenamientos de membrana en forma de *ruffles* y entran

en las células por un mecanismo dependiente de actina, sugiriendo que la macropinocitosis podría constituir una ruta alternativa para la entrada del VFA (Han *et al.*, 2016) (Fig.3). En todos los casos, el destino de la vesícula endocítica es fusionarse con endosomas tempranos de la célula. Debido al ambiente ligeramente ácido de estos compartimientos, la cápsida se desensambla en sus subunidades pentaméricas y libera el genoma viral (Fig. 3) (se profundizará en este punto en el siguiente apartado).

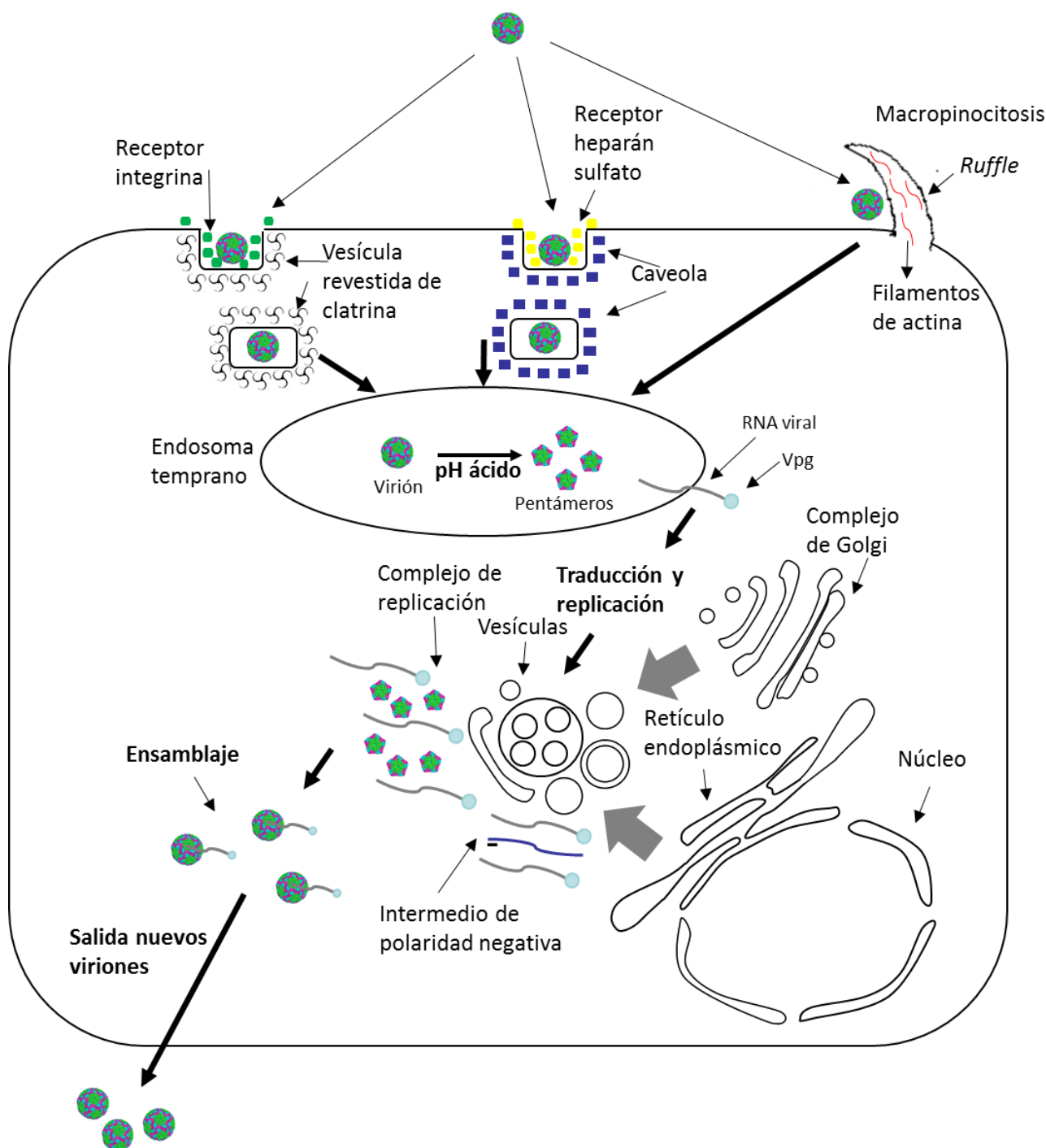


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de replicación viral de VFA. Para una explicación detallada consultar el texto.

INTRODUCCIÓN

Una vez en el citoplasma, el RNA viral actúa como mensajero y es traducido de manera independiente de CAP, dando lugar a la poliproteína viral que será procesada para producir el conjunto de proteínas virales (apartado 2.2.3). A partir de un intermedio replicativo poco caracterizado se sintetiza RNA de polaridad negativa y, a partir de éste, RNA de polaridad positiva. La expresión de las proteínas virales provoca reorganizaciones en la célula hospedadora, que incluyen el aumento del número de vesículas citoplasmáticas (Fig. 3). Aunque el origen preciso de estas vesículas no ha sido determinado todavía, éstas podrían provenir del retículo endoplásmico y/o del complejo del Golgi (García-Briones *et al.*, 2006; Knox *et al.*, 2005; Monaghan *et al.*, 2004) (Fig. 3). La traducción y replicación de los picornavirus se producen asociadas a la superficie de estas vesículas (Bienz *et al.*, 1987) (Fig.3). El ciclo viral transcurre en el citoplasma, aunque se ha observado que determinadas proteínas del virus pueden translocarse al núcleo (de Los Santos *et al.*, 2007; García-Briones *et al.*, 2006; Sánchez-Aparicio *et al.*, 2013). En cultivos celulares, el ciclo infectivo del VFA se completa normalmente en 4-6 horas con la generación de nuevos viriones y la salida de los mismos de la célula produciendo lisis celular y consiguiente efecto citopático, aunque se han descrito, también, infecciones persistentes en células BHK-21 (de la Torre *et al.*, 1988; Herrera *et al.*, 2008).

2.2.6.1 Entrada del genoma viral en el citoplasma

2.2.6.1.1 Papel de la acidificación endosomal y cambios estructurales generados en la cápsida de VFA durante la desencapsidación

Los endosomas son orgánulos celulares delimitados por una sola membrana. Se clasifican en distintos tipos: tempranos, de reciclaje y tardíos. Los endosomas tempranos son los encargados de recibir las vesículas procedente de los procesos endocíticos y actúan como principales organizadores de las distintas cargas internalizadas. Gran parte del material endocitado es reciclado hacia la membrana a través de los endosomas de reciclaje o es degradado en los endosomas tardíos o lisosomas (Huotari y Helenius, 2011; Jovic *et al.*, 2010). El tráfico endosomal está gobernado por GTPasas de la familia Rab (Schwartz *et al.*, 2007). Hay Rabs que se localizan en endosomas tempranos (Rab5), endosomas tardíos (Rab7) y endosomas de reciclaje (Rab11). El tránsito de vesículas de unos compartimentos a otros se produce por intercambio de las GTPasas Rab. Así, al madurar hacia endosomas tardíos, los endosomas tempranos van perdiendo Rab5 y ganando Rab7 (Rink *et al.*, 2005). Además de por su diferente composición en proteínas Rab, los distintos compartimentos del sistema endosomal difieren en su pH, que va acidificándose a medida que los ligandos avanzan en la ruta endosomal hacia los lisosomas, situándose entre 6.8 y 6.1 unidades de pH en los endosomas tempranos y entre

6.1 y 4.8 en los endosomas tardíos. La acidificación se produce gracias al bombeo de protones hacia el lumen del endosoma por las ATPasas vacuolares (Marshansky y Futai, 2008; Yamashiro *et al.*, 1983). El pH de los endosomas es el desencadenante de la desencapsidación de VFA (*uncoating*), provocando la disociación de la cápsida en sus subunidades pentaméricas y por lo tanto la liberación del genoma viral de su cubierta protectora, la cápsida. Las evidencias de que la liberación del genoma viral es un proceso dependiente de pH se basan en que diferentes agentes que bloquean la acidificación de los endosomas, como bases débiles e ionóforos, inhiben la infección de VFA (Baxt, 1987; Carrillo *et al.*, 1985; Carrillo *et al.*, 1984). Se ha descrito que las partículas de VFA internalizadas colocalizan con marcadores de endosomas tempranos y de reciclaje, pero no con marcadores de endosomas tardíos o lisosomas (Berryman *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2016; O'Donnell *et al.*, 2005). Además, se ha observado que el VFA de tipo O requiere la GTPasa Rab5, localizada en los endosomas tempranos, para dar lugar a una infección productiva (Johns *et al.*, 2009), habiéndose obtenido resultados similares con virus de tipo C (Vázquez-Calvo, 2012) y Asia 1 (Han *et al.*, 2016). Estos datos, juntos con el valor de pH (~ 6.6) de disociación de la cápsida (Curry *et al.*, 1995; Martín-Acebes *et al.*, 2010) sugieren que la desencapsidación de VFA tiene lugar dentro de endosomas tempranos.

Este mecanismo de internalización y desensamblaje en las células, es consistente con la extrema labilidad de los viriones de VFA, que se inactivan a un pH muy cercano a la neutralidad (Brown y Cartwright, 1961; Randrup, 1954). La labilidad a pH ácido del virión se ha descrito también en el virus de la rinitis equina A, en cardiovirus y en rinovirus (Newman *et al.*, 1973), pero no en enterovirus como poliovirus, en los que la entrada en la célula no requiere de una bajada del pH (Perez y Carrasco, 1993). La inactivación de la infectividad de los viriones de VFA a pH ácido correlaciona con la disociación física de la cápsida en sus subunidades pentaméricas (Martín-Acebes *et al.*, 2011b), lo cual hace posible el estudio del proceso de desensamblaje mediante el análisis de la infectividad de los viriones.

En una interfaz interpentamérica, las proteínas VP2 y VP3 de pentámeros opuesto se mantienen unidas por interacciones electrostáticas, puentes hidrógeno e interacciones hidrofóbicas débiles que, en su conjunto, mantienen la estabilidad de la cápsida (Acharya *et al.*, 1989; Ellard *et al.*, 1999; Lea *et al.*, 1994; Mateo *et al.*, 2003) (Fig. 4). Por lo tanto, en el proceso de disociación de la cápsida de VFA, los residuos situados en las interfaces interpentaméricas juegan un papel fundamental. Entre ellos, se ha dado especial importancia a las histidinas (His, H). La razón para ello es que cuando una His se encuentra expuesta en ambiente acuoso (como es el caso de una interfaz), su pKa es muy cercano al pH fisiológico. Sin embargo, a pH por debajo de la neutralidad, se protona. De esta manera,

INTRODUCCIÓN

las histidinas actúan como sensores de pH, ya que son los principales aminoácidos que detectan la bajada de pH que se produce cuando la partícula viral entra en el sistema endosomal. La protonación de un residuo de His introduce una carga positiva en la proteína, produciendo repulsión con otras cargas positivas ya existentes, lo que puede originar cambios estructurales que originen el desensamblaje de la partícula viral (Ellard *et al.*, 1999; van Vlijmen *et al.*, 1998). La capacidad de las His de actuar como sensores de pH también es explotada por otras proteínas no virales (Lazar *et al.*, 2003; Nordlund *et al.*, 2003). El VFA es el picornavirus más sensible a pH ácido, habiéndose propuesto que esta característica se debe al gran número de residuos de His agrupados en la interfaz interpentamérica de su cápsida. Estos residuos están conservados y se sitúan muy cerca de otros muchos residuos cargados positivamente del pentámero opuesto (Curry *et al.*, 1995; Twomey *et al.*, 1995). De especial importancia son las His 142 y 145 en VFA de tipo A (Acharya *et al.*, 1989; Biswal *et al.*, 2016; Curry *et al.*, 1995; Ellard *et al.*, 1999; van Vlijmen *et al.*, 1998), que corresponden a las His 140 y 143 en VP3 de C-S8c1. De hecho, se ha propuesto un modelo según el cual la His 142 (140 en C-S8c1), puede dar lugar a una interacción carga-dipolo que contribuiría a la inestabilidad de la cápsida (Curry *et al.*, 1995).

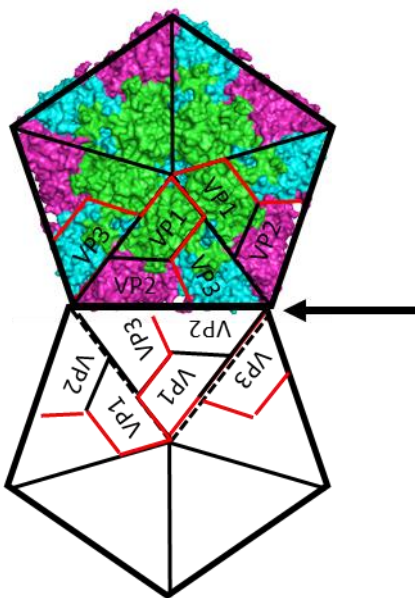


Figura 4. Representación esquemática de dos pentámeros opuestos de la cápsida de VFA en un eje de simetría 2. Las líneas rojas delimitan dos de los cinco protómeros que componen el pentámero. Las proteínas VP2 y VP3 de protómeros adyacentes están en contacto con las mismas proteínas en el pentámero opuesto formando una interfaz interpentamérica (indicada con la flecha). VP1 en verde, VP2 en magenta, VP3 en cian.

Aunque el mecanismo de entrada del RNA de VFA en el citoplasma a través de la membrana endosomal es gran parte desconocido, se ha propuesto que en este proceso participa VP4 (Knipe *et al.*, 1997). Esta proteína, que se libera del virus durante el desensamblaje de la cápsida, es altamente hidrofóbica y está miristilada (Belsham *et al.*, 1991; Chow *et al.*, 1987). Gracias a esto, podría

contribuir a la generación de poros en la membrana endosomal de la misma manera que se ha descrito para rinovirus (Berka *et al.*, 2009; Brabec *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2008; Fuchs y Blaas, 2010; Garriga *et al.*, 2012). En poliovirus, después de la unión con el receptor, el virión se desestabiliza, transformándose en una partícula 135 S en la que VP4 está ausente y el extremo N-terminal de VP1 es externalizado contribuyendo a la salida del genoma viral del endosoma (Belnap *et al.*, 2000; Bubeck *et al.*, 2005; Butan *et al.*, 2014). Aunque en otros aftovirus, como el virus de la rinitis equina A, se ha observado un cambio conformacional importante en la estructura del virus en un estado previo a la disociación en pentámeros (Tuthill *et al.*, 2009) (apartado 2.3), por el momento no existen evidencias de la existencia de cambios conformacionales similares durante la desencapsidación de VFA.

2.2.6.1.2 Mutaciones que afectan la estabilidad de la cápsida de VFA frente a pH ácido

La sensibilidad de la cápsida a pH ácido puede variar ligeramente entre diferentes aislados y serotipos de VFA (Curry *et al.*, 1995). Por otro lado, debido a su organización en cuasiespecies, en el interior de una población viral existen múltiples variantes cuya estabilidad a pH es, a menudo, diferente de la de la población total (Liang *et al.*, 2014; Martín-Acebes *et al.*, 2010; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Twomey *et al.*, 1995; Vázquez-Calvo, 2012; Wang *et al.*, 2014). Este hecho ha permitido seleccionar variantes del virus con sensibilidad a pH ácido alterada que se pueden dividir en dos grupos: i) los que, por presentar una cápsida más lábil, desencapsidan a un valor de pH más alcalino (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012) y ii) los que, por presentar una cápsida más estable, necesitan un pH más ácido para desencapsidar (Liang *et al.*, 2014; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Twomey *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2014). La frecuencia de aislamiento de mutantes de VFA con cápsidas más lábiles frente a pH ácido y resistentes al tratamiento con NH₄Cl es elevada, oscilando entre valores del orden de 10⁻¹ a 10⁻³ (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012), a diferencia de lo observado para las variantes de VFA resistentes a pH ácido cuya frecuencia de selección es más baja, del orden de 10⁻⁵ (Martín-Acebes *et al.*, 2011a), y más cercana a la observada para variantes resistentes a anticuerpos monoclonales (Carrillo *et al.*, 1990).

La capacidad de liberar el material genético a un valor de pH más alto es un mecanismo que se ha descrito en mutantes aislados en otros virus como el virus de la gripe (Daniels *et al.*, 1985; Doms *et al.*, 1985), el virus de la estomatitis vesicular (Fredericksen y Whitt, 1998), el virus dengue (Guirakhoo *et al.*, 1993) y el virus del Nilo Occidental (Martín-Acebes *et al.*, 2013). La estrategia

INTRODUCCIÓN

normalmente usada para aislar este tipo de mutantes es someter al virus a una presión selectiva con compuestos que aumentan el pH endosomal, como el NH_4Cl y la Con A.

En el caso del VFA, empleando NH_4Cl para bloquear la acidificación endosomal se han seleccionado diferentes mutantes que presentan un incremento de la sensibilidad a pH ácido de la cápsida (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). Tres de las mutaciones encontradas en estos mutantes se localizan en residuos de alanina (Ala, A) muy cercanos entre sí: VP3 A116V, A118V y A123T (Fig. 5) y muy cerca del borde interpentamérico, en la lámina β -E de VP3 (Lea *et al.*, 1994). Además, todas ellas suponen la introducción de un residuo más voluminoso que podría generar perturbaciones estructurales responsables del incremento en la sensibilidad a pH ácido de la cápsida (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). Entre estas mutaciones, cabe resaltar el cambio VP3 A116V, que ha sido observado en varios mutantes aislados a partir de virus recuperado de lesiones de animales infectados con VFA, indicando que mutantes con estas características pueden estar representados en las cuasiespecies de hospedadores naturales. Además, este cambio aparece aislado, sin mutaciones adicionales que pudieran estar compensando una hipotética bajada en *fitness*, como se ha observado, por ejemplo, con otras mutaciones como VP3 A118V (Martín-Acebes *et al.*, 2010). Por ello, durante esta Tesis Doctoral se ha utilizado el mutante VP3 A116V como modelo de VFA que desencapsida a pH más alcalino.

Por otro lado, para seleccionar mutaciones que confieren resistencia a pH ácido, una estrategia comúnmente usada es la de preincubar los virus a pH suficientemente ácido para que sólo las variantes más resistentes sobrevivan al tratamiento. Siguiendo este abordaje se mostró que, en rinovirus humano 14, mutaciones cerca de la región del bucle G-H en VP1 conferían resistencia a pHs ácidos (~ 4.5) (Giranda *et al.*, 1992; Skern *et al.*, 1991). El primer mutante de VFA resistente a pH ácido fue aislado y caracterizado a partir de un virus del serotipo A. Este mutante, denominado AR (*acid resistant*) presentaba 3 mutaciones con respecto al parental: VP1 A3S, VP2 E131K y VP2 D133S. Puesto que estas mutaciones no se encontraron aisladas, no se pudo determinar si alguna de ellas podía conferir resistencia al virus por sí sola (Twomey *et al.*, 1995). Sin embargo, recientemente se ha identificado una única sustitución capaz de incrementar la resistencia a pH ácido de la cápsida de VFA, VP1 N17D (Fig. 5). Esta sustitución fue identificada por primera vez en el serotipo C (Martín-Acebes *et al.*, 2011b) y más recientemente en los serotipos O (Liang *et al.*, 2014) y Asia 1 (Wang *et al.*, 2014), en poblaciones virales sometidas a tratamiento con pH ácido. Este cambio permite al virus conservar parte de su infectividad a un pH de hasta 6.0, menor que el normalmente tolerado por el virus parental (~ 6.6). Curiosamente, Wang *et al.* (2014) han descrito que en el serotipo Asia 1 la

sustitución N17D se selecciona acompañada por otras mutaciones, entre ellas VP2 H145Y, que se asocia también a un incremento en la resistencia a pH ácido del virus. Cuando estas dos mutaciones se introdujeron en la cápsida del virus, el resultado fue una mayor estabilización de la misma (Park *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014). El residuo VP1 N17 se encuentra en la cara interna de la cápsida y no lo suficientemente cerca del borde interpentamérico para sugerir que esté actuando de forma directa en la estabilización de la interacción entre pentámeros (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Se ha propuesto que la introducción de la carga negativa debido a la sustitución VP1 N17D podría interferir con la protonación de algunas de las His implicadas en la desencapsidación de VFA (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Además de aumentar la resistencia a pH ácido, la mutación N17D confiere una mayor termoestabilidad a la población viral que la presenta (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Por estas características, el mutante VP1 N17D se ha utilizado como modelo de VFA resistente a pH ácido a lo largo de esta Tesis Doctoral. Otra mutación, que podría contribuir a aumentar la estabilidad de la cápsida a pH ácido es VP2 F34L, localizada en el extremo N-terminal de VP2, que se ha encontrado acompañando a VP1 N17D en un mutante de serotipo C (Fig. 5) (Martín-Acebes *et al.*, 2011b).

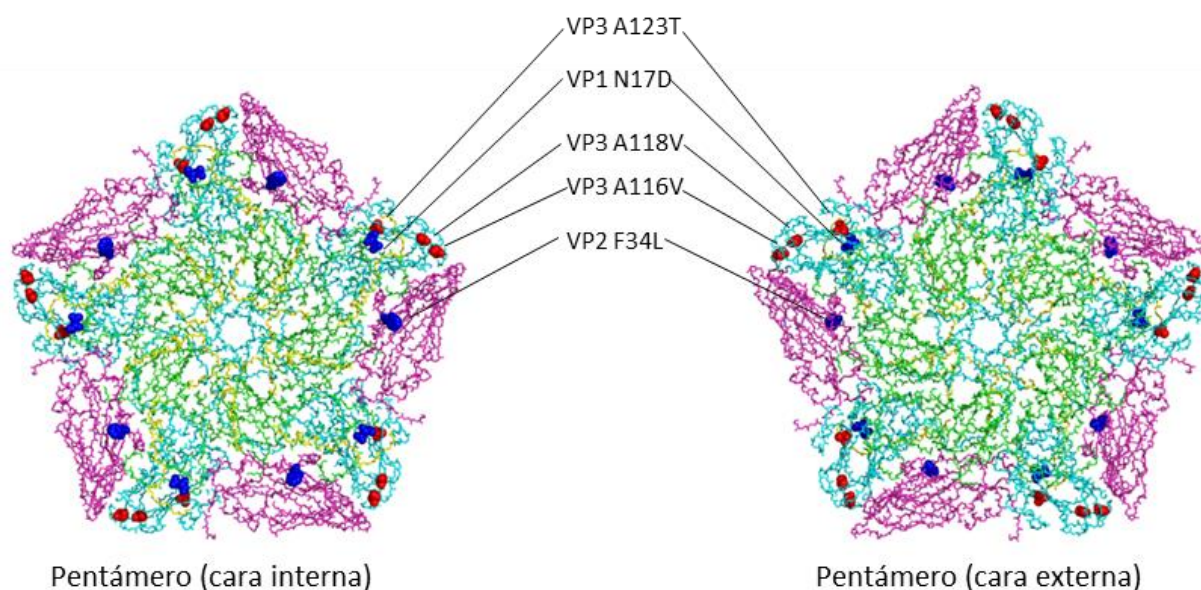


Figura 5. Localización de sustituciones que modifican la estabilidad de la cápsida de VFA frente a pH ácido. En esferas azules, se representan los residuos que confieren estabilidad y en esferas rojas las que hacen el virus más sensible a pH ácido. Se muestra la cara interna (a la izquierda) y externa (a la derecha) del pentámero. Las cadenas laterales de los aminoácidos han sido omitidas para simplificar la figura. VP1 en verde, VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo.

Se ha descrito recientemente que, en VFA de tipo A, una mutación (VP3 H142D) en la His propuesta como principal sensor de pH (apartado 2.2.6.1.1), incrementa la resistencia a pH ácido del virion sin alterar su inmunogenicidad y sin comprometer la capacidad de crecimiento del virus en cultivos celulares (Biswal *et al.*, 2016).

INTRODUCCIÓN

2.2.6.2 – Etapas tardías: ensamblaje y maduración de los viriones

El precursor de las proteínas estructurales codificado en la región P1 es cortado en VP0 (VP4+VP2), VP1 y VP3 por la proteasa 3C. Estas tres proteínas se asocian para formar protómeros inmaduros que a su vez se ensamblan en pentámeros (Baranowski *et al.*, 2000; Grubman y Baxt, 2004). Los mecanismos de ensamblaje de la cápsida y de encapsidación del RNA son poco conocidos para VFA. Se ha descrito que en muchos picornavirus, incluso VFA, el ensamblaje de los pentámeros es dependiente de la miristilación del extremo N-terminal de VP4, que en este momento del ciclo viral todavía existe solo como prolongación amino-terminal de VP2 formando parte del precursor VP0 (Goodwin *et al.*, 2009; Moscufo *et al.*, 1991). En poliovirus se han formulado dos teorías sobre como ocurre la formación de nuevos viriones. La primera es que mediante el ensamblaje de los pentámeros se genere una cápsida vacía, así llamada porque no lleva RNA viral en su interior. El RNA genómico, unido a VPg en su extremo 5', entraría en la cápsida en un siguiente paso, formando un provirión (Jacobson y Baltimore, 1968). Como alternativa a este modelo, otros autores apoyan la hipótesis de que los pentámeros interaccionen directamente con VPg-RNA formando un provirión, sin pasar por el intermedio de la cápsida vacía que existiría como forma de almacenamiento de pentámeros (Verlinden *et al.*, 2000).

La maduración completa del virión ocurre tras el corte de VP0 en VP2 y VP4, que separa los 85 residuos del extremo N-terminal de VP0 que constituyen VP4 de los restantes correspondientes a VP2 (Arnold *et al.*, 1987; Grubman *et al.*, 2004). En los picornavirus, el corte de VP0 en VP2 y VP4 se ha asociado con la encapsidación del RNA (Arnold *et al.*, 1987; Hogle *et al.*, 1985; Rossmann *et al.*, 1985) y es crucial para la estabilidad e infectividad del virión (Ansardi y Morrow, 1995; Basavappa *et al.*, 1994; Fernandez-Tomas y Baltimore, 1973; Knipe *et al.*, 1997). Gracias al estudio de estructuras de cápsidas vacías de VFA y poliovirus, se ha formulado la hipótesis que la H145 de VP2, correspondiente a la H195 en poliovirus, podría mediar el corte de VP0 (Basavappa *et al.*, 1994; Curry *et al.*, 1997). Este residuo se sitúa muy cerca del enlace peptídico que une VP2 y VP4, del que se encuentra separado únicamente por dos moléculas de H₂O, y se localiza en el fondo de una depresión hidrofóbica en el interior de la cápsida que podría acomodar el RNA (Basavappa *et al.*, 1994; Curry *et al.*, 1997). Considerando su posición estratégica, la H145/195 podría producir un ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico que une VP2 y VP4, a través de la activación de una molécula de H₂O, proceso en el que el RNA viral podría actuar como catalizador (Basavappa *et al.*, 1994; Curry *et al.*, 1997). Este residuo de His está conservado en todos los picornavirus, lo que apoya su relevancia funcional. De hecho, en poliovirus y en VFA se ha descrito que la sustitución del residuo H145/195

por diferentes aminoácidos (glicina, arginina, treonina, aspártico en poliovirus; lisina, serina, treonina en VFA) genera virus no viables en cultivos celulares (Hindiyeh *et al.*, 1999). En estos virus el corte de VP0 en VP2 y VP4 no se produce, o el ciclo viral se encuentra bloqueado en etapas anteriores, como el plegamiento de P1 o la encapsidación del RNA (Hindiyeh *et al.*, 1999).

2.3 El virus de la rinitis equina A

El virus de la rinitis equina A (VREA) es un picornavirus inicialmente incluido dentro del género rinovirus, denominándose rinovirus equino 1. Tras conocerse que la organización genómica de este virus era más similar a la del VFA que a los rinovirus (apartado 2.1), el VREA forma ahora parte del género de los aftovirus (Pringle, 1999). El VREA es considerado un modelo alternativo tanto para el estudio de la biología de VFA como para el ensayo de antivirales, dado que su manipulación no requiere un nivel de bioseguridad de tipo 3 (Bakker *et al.*, 2014; Groppelli *et al.*, 2010; Osiceanu *et al.*, 2014). A diferencia de los rinovirus, VREA infecta un largo repertorio de tipos celulares *in vitro* y *en vivo* y, como VFA, puede producir infecciones persistentes en cultivos celulares (Li *et al.*, 1996).

El genoma del VREA tiene una longitud aproximada de 6.7 kb y está íntegramente secuenciado, con la excepción de una pequeña región en el extremo 5' (Li *et al.*, 1996). Como en todos los picornavirus, el VREA codifica una única poliproteína que se procesa por las proteasas virales, las mismas que llevan a cabo esta proteólisis en VFA. La organización del genoma es en general muy similar a la de VFA, con la excepción de la proteína VPg que en el VREA está presente en una sola copia. La secuencia nucleotídica comparte con VFA alrededor de un 40% de identidad, siendo este porcentaje el más alto con respecto a otros picornavirus. Con VFA comparte además la presencia de 2 tripletes de inicio de la traducción que dan lugar a dos proteínas L con propiedades autocatalíticas, así como una alta homología (87.5%) en los residuos de la proteína 2A, de un tamaño de 16 aminoácidos (Li *et al.*, 1996); en otros Picornavirus, la proteína 2A es más larga (142-149 aminoácidos) (Forss *et al.*, 1984; Rueckert, 1990).

INTRODUCCIÓN

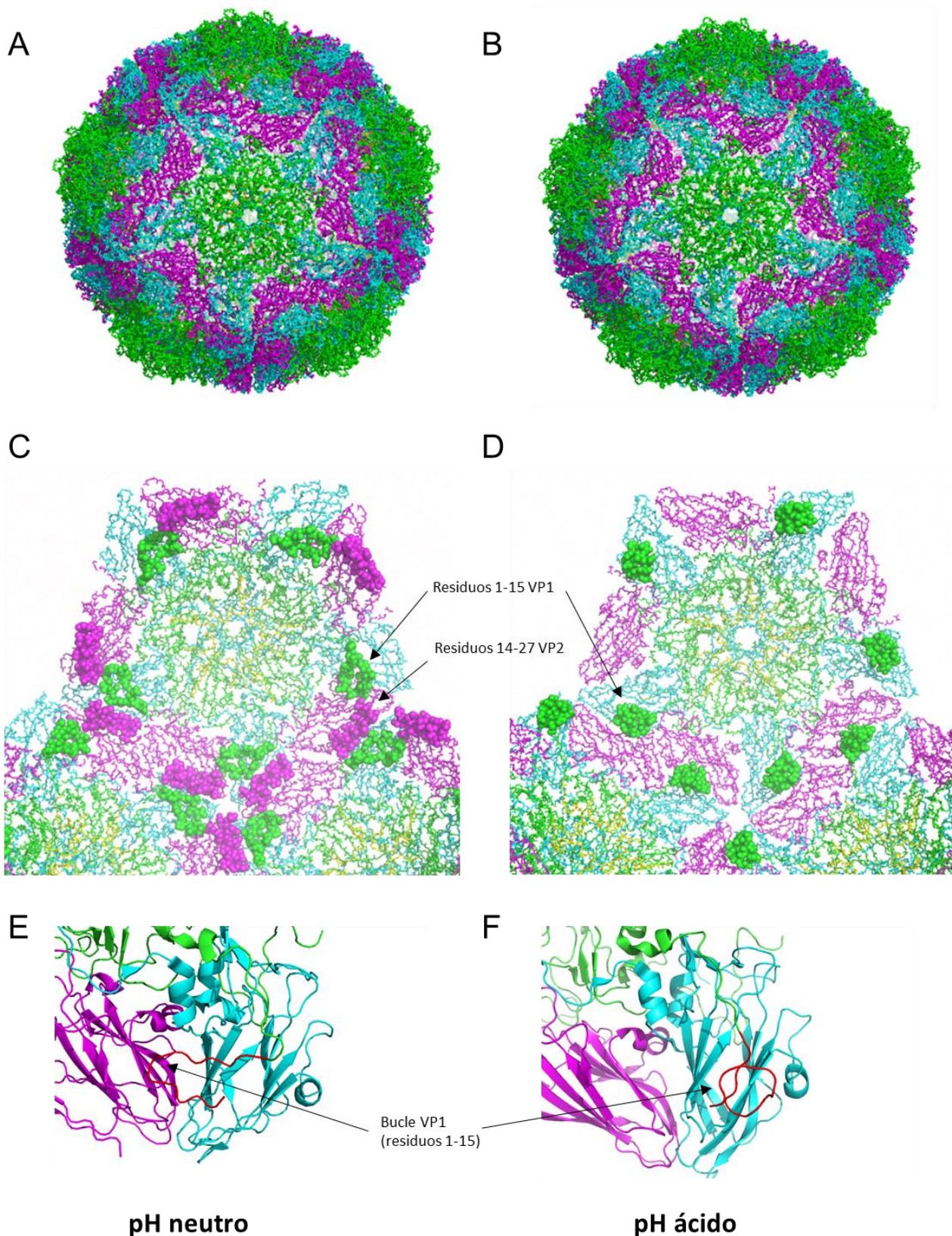


Figura 6. Conformación de la cápsida y de la región interpentamérica de VREA a pH neutro y ácido. Estructura de la cápsida de VREA a pH neutro (A) y a pH ácido (B). Tres pentámeros en contacto entre ellos en un eje de simetría 3 a pH neutro (C) y a pH ácido (D). Las esferas verdes indican el N-terminal de VP1 (residuos 1-15) y las esferas magenta indican la horquilla de VP2 (residuos 12-30). Conformación del bucle del N-terminal de VP1 (en rojo) a pH neutro (E) y a pH ácido (F). VP1 en verde, VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo. Adaptado de Tuthill *et al.*, 2009.

El VREA fue aislado a partir de muestras de nasofaringe de caballos por primera vez en el Reino Unido (Plummer, 1962), siendo posteriormente encontrado en Europa, Estados Unidos y Australia (Ditchfield y Macpherson, 1965; Hofer, 1973; Holmes, 1978; Studdert y Gleeson, 1977). Los signos clínicos asociados a la infección con VREA son similares a los observados con rinovirus, produciendo un síndrome agudo respiratorio con anorexia, secreciones nasales, faringitis, bronquitis y tos asociado a fiebre alta (Burrows, 1969; Carman *et al.*, 1997; Diaz-Mendez *et al.*, 2014; Studdert y Gleeson, 1978). Cabe resaltar que este virus se encuentra frecuentemente asociado a otros patógenos y también se ha detectado en animales clínicamente sanos, lo que complica el establecimiento de una relación causa-efecto entre su presencia y la enfermedad observada (Fukunaga *et al.*, 1981; Horsington *et al.*, 2013; Studdert y Gleeson, 1978).

Se ha descrito que VREA usa ácido siálico como receptor para su entrada en la célula (Stevenson *et al.*, 2004). Como en VFA, su endocitosis es mediada por clatrina y la liberación del RNA viral es dependiente del pH endosomal (Groppelli *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque el virión es sensible a pH ácido, la disociación de la partícula ocurre a un pH más bajo (< 5.5) del requerido por VFA (< 6.5) (Tuthill *et al.*, 2009). Además, a diferencia de VFA, estudios recientes demuestran que el virión de VREA es muy plástico y estable en conformaciones diferentes de la nativa (Bakker *et al.*, 2014; Tuthill *et al.*, 2009).

La cápsida de VREA mantiene la arquitectura típica de todos los picornavirus con 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) organizadas en protómeros y pentámeros y un coeficiente de sedimentación de 150 S. Las proteínas VP2, VP3 y parte de VP4 son muy similares a las de VFA, mientras que VP1 es bastante diferente, presentando mayor homología con la de los cardiovirus (Tuthill *et al.*, 2009). En la interfaz interpentamérica, existen muy pocos residuos de histidina en comparación con VFA, lo que podría explicar su menor sensibilidad a pH ácido (Tuthill *et al.*, 2009). Observando la estructura cristalográfica del VREA en su conformación nativa se puede observar que los residuos de 14-27 de VP2 forman una horquilla rica en residuos hidrofóbicos que estabiliza la interfaz interpentamérica (Fig. 6C). Por otro lado, los primeros 15 residuos en el extremo N-terminal de VP1 forman un bucle que hace de puente entre VP2 y VP3 en el interior del protómero (Figura 6E). La estabilidad de la capsida de VREA ha permitido caracterizar un intermedio de desencapsidación de este virus a pH ácido (Tuthill *et al.*, 2009). Al comparar las dos estructuras, nativa y a pH ácido, estos dos elementos (N-terminal de VP1 y residuos 14-27 de VP2) son los que se ven más claramente modificados. En la estructura a pH ácido, el extremo N-terminal de VP2, incluida la horquilla, se desordena, (Fig. 6D) y el bucle del N-terminal de VP1 cambia su conformación,

INTRODUCCIÓN

extendiéndose a la interfaz interpentamérica (Figura 6D y 6E). A diferencia de lo observado en enterovirus, la estructura de VREA en su conformación nativa y la de las partículas expuesta a pH ácido son muy similares (Fig. 6A y 6B). No hay una expansión de la partícula, ni apertura de poros a través de los cuales el RNA viral podría encontrar una salida. Tampoco hay externalización de VP1 ni pérdida de VP4, todos cambios observados en poliovirus y rinovirus (Belnap *et al.*, 2000; Hewat y Blaas, 2004; Hewat *et al.*, 2002). Así pues, estas partículas expuestas a pH ácido, a pesar de haber perdido el RNA viral, siguen conservando la mayoría de las copias de VP4 (Tuthill *et al.*, 2009).

3. Objetivos

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Investigar las bases moleculares que regulan la estabilidad de la cápsida de VFA mediante el análisis del efecto combinado de mutaciones que alteran su sensibilidad a pH ácido.
2. Aislar y caracterizar variantes de VFA con cápsidas más estables y evaluar su potencial inmunogénico en un importante hospedador natural, el cerdo.
3. Estudiar las bases moleculares que regulan la estabilidad de la cápsida de otro aftovirus: el VREA.

4. Materiales y métodos

4.1 Cultivos de células eucarióticas

Las líneas celulares empleadas fueron:

-BHK-21: fibroblastos de riñón de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) (Stoker y Macpherson, 1964).

-Vero: células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (Rhim y Schell, 1967).

Todas las líneas celulares se crecieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco), suplementado con 100 U/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma), 2 mM L-glutamina (Gibco) y 5% suero fetal bovino (SFB), a 37° C en una atmósfera con 7% CO₂ y 98% de humedad.

Las células fueron almacenadas en nitrógeno líquido tras un proceso de congelación lenta en una mezcla de 90% SFB y 10% DMSO (Sigma). Para su descongelación se introdujeron en un baño a 37° C, se centrifugaron a 250 x g durante 5 min y se distribuyeron en placas de cultivos celular en medio completo con 10% SFB. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se despegaron de las placas utilizando una mezcla de 0.05 mg/ml de tripsina (Difco) y 0.016% EDTA (Merck) y se sembraron en placas nuevas a la dilución deseada (pase).

4.2 Virus

En esta Tesis Doctoral se han utilizado distintos variantes de VFA que se enumeran a continuación:

- C-S8c1: clon biológico de VFA obtenido mediante triple purificación de placa a partir del aislado natural C Santa Pau Sp/70 (Santa Pau, Girona 1970), representativo del subtipo europeo (C₁) del serotipo C de VFA (Sobrino *et al.*, 1983). En los experimentos en los que fue recuperado a partir del clon infeccioso pMT28 (descrito en el siguiente apartado), se indica esta información.

- C-S8c1m6 (denominado m6): mutante con resistencia incrementada a pH 6 obtenido previamente en el laboratorio tras el tratamiento de la población del virus C-S8c1 con pH 6 y posterior clonaje biológico (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Este mutante presenta la sustitución de nucleótido A3256G que codifica el cambio de aminoácido VP1 N17D.

- O₁K: VFA serotipo O recuperado del clon infeccioso pO₁K (Sáiz *et al.*, 2001).

En esta Tesis Doctoral también se ha utilizado otro aftovirus, estrechamente relacionado a VFA:

- Virus de la Rinitis Equina A (VREA): cedido amablemente por la Dra. C.A. Hartley (*Centre for Equine Infectious Disease, Department of Veterinary Science, The University of Melbourne, Australia*). Este

RESULTADOS

virus presenta un cambio nucleótido sinónimo (G222T) con respecto a la P1 del aislado NM-11/67 (Gen Bank FJ607143).

4.3 Clones infecciosos

Los plásmidos que expresan el genoma completo del VFA utilizados se esquematizan en la Fig. 7. Estos fueron:

-pMT28: codifica el RNA genómico del aislado C-S8c1 (García-Arriaza *et al.*, 2004). Este clon infeccioso fue amablemente cedido por la Dra Escarmís (CBMSO). La numeración de los nucleótidos del genoma de VFA utilizada corresponde a la descrita para C-S8c1 en (Toja *et al.*, 1999) (Gen Bank: AJ133357).

Asimismo, se emplearon los siguientes plásmidos derivados de pMT28:

-pMT28 VP3 A116V: contiene la sustitución de nucleótido C2897T que codifica el cambio de aminoácido VP3 A116V (Vázquez-Calvo, 2012).

-pMT28 VP3 A118V: contiene la sustitución de nucleótido C2903T que codifica el cambio de aminoácido VP3 A118V (Martín-Acebes *et al.*, 2010).

-pMT28 VP1 N17D: contiene la sustitución A3256G que codifica el cambio de aminoácido VP1 N17D, y la sustitución silenciosa C3117T (Martín-Acebes *et al.*, 2011b).

En el curso de esta Tesis Doctoral se han construido nuevos clones infecciosos derivados del pMT28, que se enumeran a continuación:

-pMT28 VP3 A116V VP1 N17D: contiene las sustituciones C2897T y A3256G que codifican los cambios de aminoácidos VP3 A116V y VP1 N17D, respectivamente (apartado 4.6), y la sustitución silenciosa C3117T.

-pMT28 VP3 A118V VP1 N17D: contiene las sustituciones C2903T y A3256G que codifican los cambios de aminoácido VP3 A118V y VP1 N17D, respectivamente (apartado 4.6), y la sustitución silenciosa C3117T.

-pMT28 VP1 V11I: contiene la sustitución G3238A que codifica el cambio de aminoácido VP1 V11I (apartado 4.6).

-pMT28 VP1 T12A+N17D: contiene las sustituciones A3241G y A3256G que codifican los cambios VP1 T12A y VP1 N17D, respectivamente (apartado 4.6), y la sustitución silenciosa T3117C.

-pMT28 VP3 A116T+A118V VP1 N17D: contiene las sustituciones C2896T, C2903T y A3256G que codifican los cambios VP3 A116T, A118V y VP1 N17D, respectivamente (apartado 4.6), y las sustituciones silenciosas T3117C y A3444G.

-pMT28 VP3 A116V VP1 N17D+T22N: contiene las sustituciones C2897T, A3256G y 3272A que codifican los cambios VP3 A116V, VP1 3256G y VP1 T22N, respectivamente, y las sustituciones silenciosas T3317C y T3315C (apartado 4.6).

-pMT28 H145Y: contiene la sustitución C2329T que codifica el cambio de aminoácido VP2 H145Y (apartado 4.6).

-pMT28 VP2 H145Y VP1 N17D: contiene las sustituciones C2329T y A3256G que codifican los cambios de aminoácidos VP2 H145Y y VP1 N17D, respectivamente (apartado 4.6).

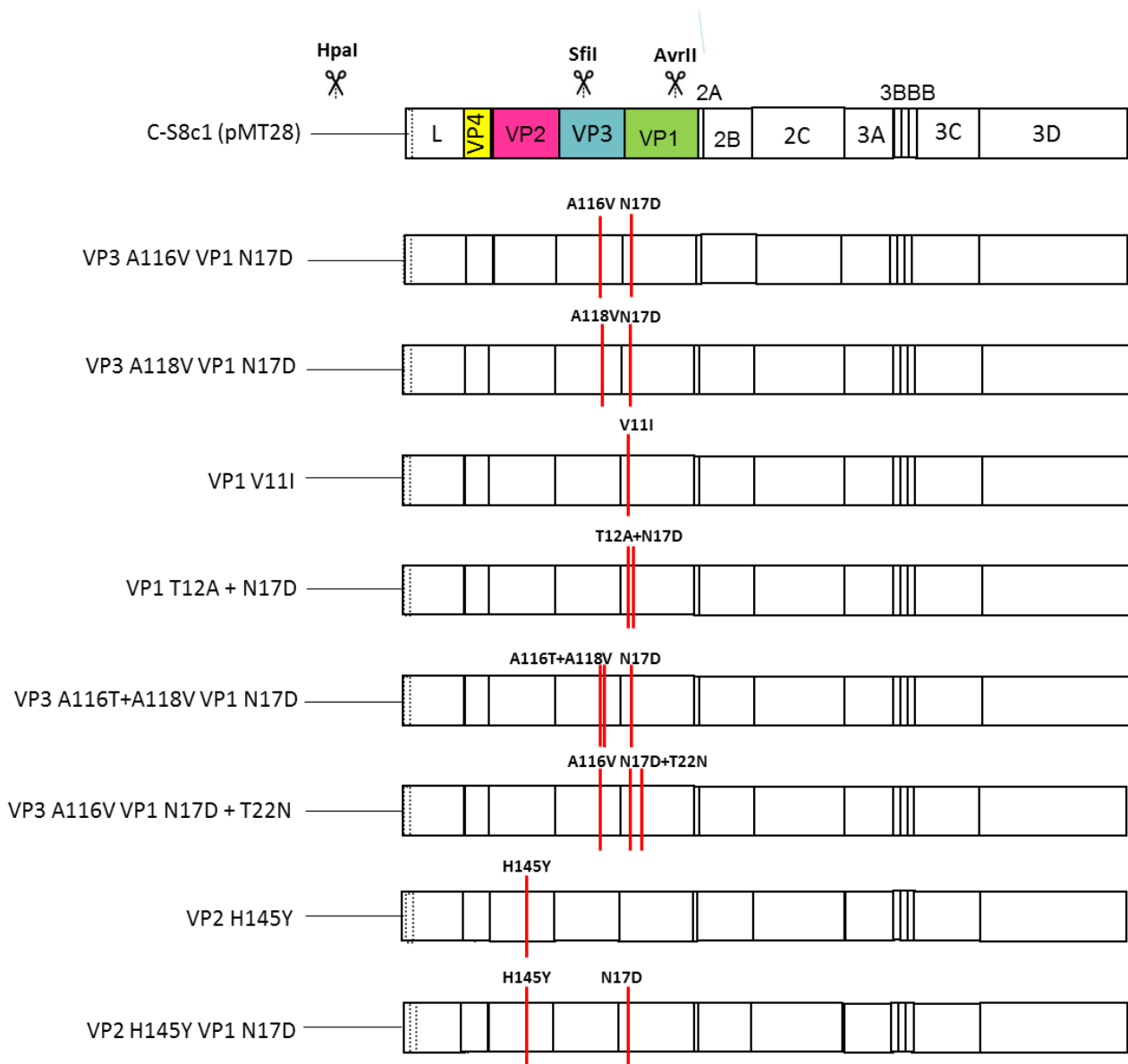


Figura 7. Clones infecciosos de VFA derivados de pMT28 construidos. Se indican las posiciones de las dianas de restricción empleadas en los clonajes (HpaI, SfiI, AvrII) así como las sustituciones de aminoácido introducidas en cada clon (líneas rojas). Para una explicación detallada de la estrategia de clonaje usada en cada uno de los casos, consultar el texto (apartado 4.6).

RESULTADOS

4.4 Animales

Para la vacunación con las partículas inactivadas de VFA, se emplearon cerdos Landrace X Large White de 6 semanas de edad, que fueron mantenidos en las instalaciones de nivel P3 del IVI (*Institute of Virology and Immunology*, Mittelhausern, Suiza).

Para la obtención de las células dendríticas porcinas, se emplearon cerdos de alrededor de 80 kg de peso, mantenidos en condiciones SPF (*specific pathogen-free*) en las instalaciones del IVI.

4.5 Infecciones virales

4.5.1 Infecciones en medio líquido

Las monocapas celulares fueron infectadas con la multiplicidad de infección (m.d.i.), definida como UFP/célula, elegida. Durante la primera hora de infección las placas fueron agitadas cada 15 min. Transcurrido este periodo de tiempo, el inóculo fue retirado y se añadió medio fresco con 5% SFB, considerándose este momento como tiempo 0 p.i. En todos los casos, excepto en la infección de células dendríticas (apartado 4.17), las infecciones se realizaron a 37 °C. Para los tratamientos con NH₄Cl (Merck), las células fueron preincubadas 1 h con el medio con NH₄Cl (0, 5, 10 o 25 mM) suplementado con HEPES pH 7.4 (10 o 25 mM), manteniendo el compuesto durante toda la infección. La duración total de la infección se indica en cada caso. Para el experimento con Con A (concentración de uso 100 nM), las células fueron preincubadas durante 30 min con el fármaco, que se mantuvo durante toda la infección.

4.5.2 Titulación de virus mediante TCID₅₀

Para titular el preparado viral usado en los ensayos de seroneutralización (apartado 4.19.3), se incubaron diluciones seriadas en base 10 del virus con células BHK-21 crecidas en placas de 96 pocillos. Tras 3 días de incubación a 37 °C, se comprobó el efecto citopático al microscopio. La TCID₅₀ se calculó usando el algoritmo de Spearman and Karber (Hierholzer JC, 1996).

4.5.2 Infecciones en medio semisólido

4.5.2.1 Titulación de virus mediante ensayo de plaqueo

Para determinar el título viral producido tras una infección, las placas conteniendo las células infectadas fueron congeladas para permitir la rotura de las membranas celulares y la liberación al medio del virus intracelular, obteniéndose de esta forma el virus total (virus en sobrenadante más virus intracelular). La titulación de virus extracelular se llevó a cabo a partir de sobrenadante de células infectadas.

La titulación de los diferentes virus se realizó infectando por duplicado monocapas de células BHK-21 (en el caso de VFA) o Vero (en el caso de VREA) crecidas en placas de 6 pocillos de 35 mm de diámetro (Falcon). Para ello se realizaron diluciones seriadas en base 10 de las suspensiones virales con las que se infectaron monocapas cercanas a confluencia, de acuerdo a lo descrito en el apartado anterior. Tras la primera hora de infección, se retiró el inóculo y se añadió medio semisólido (0.5% agar, 1-2% SFB dependiendo del grado de confluencia y 0.045 mg/ml DEAE-dextrano en DMEM). Transcurridas 24-30 h en el caso de VFA, o 48-60 h en el caso de VREA, las células se fijaron con una solución de 4% formaldehído durante 15 min y se tiñeron con una solución de 2% de cristal violeta en 2% formaldehído. Las placas fueron lavadas con agua para retirar el exceso de cristal violeta y se dejaron secar al aire. Una vez secas, se contaron las placas de lisis denominadas unidades formadoras de placa (UFP) formadas.

4.5.2.2 Clonaje biológico

Las monocapas de células BHK-21 (para VFA) o Vero (para VREA) subconfluentes fueron infectadas en medio semisólido según lo descrito en el apartado anterior y los virus contenidos en placas de lisis bien aisladas fueron recogidos utilizando una punta de micropipeta. Los virus recuperados fueron resuspendidos en 300-500 μ l de DMEM y amplificados mediante infección en medio líquido.

4.5.2.3 Neutralización de virus con anticuerpos monoclonales

100 UFP de virus se incubaron con diluciones de sobrenadante de hibridoma de anticuerpos monoclonales durante 1 hora a t.a. A continuación, estas muestras se emplearon para infectar monocapas subconfluentes de células BHK-21. Las UFP restantes (no neutralizadas por el anticuerpo) se determinaron mediante ensayo de plaqueo.

4.6 Clonajes moleculares

Los diferentes clones infecciosos derivados de pMT28 (García-Arriaza *et al.*, 2004) construidos durante esta Tesis Doctoral (apartado 4.3) y los sitios de restricción empleados para su clonaje están esquematizados en la Fig. 7.

RESULTADOS

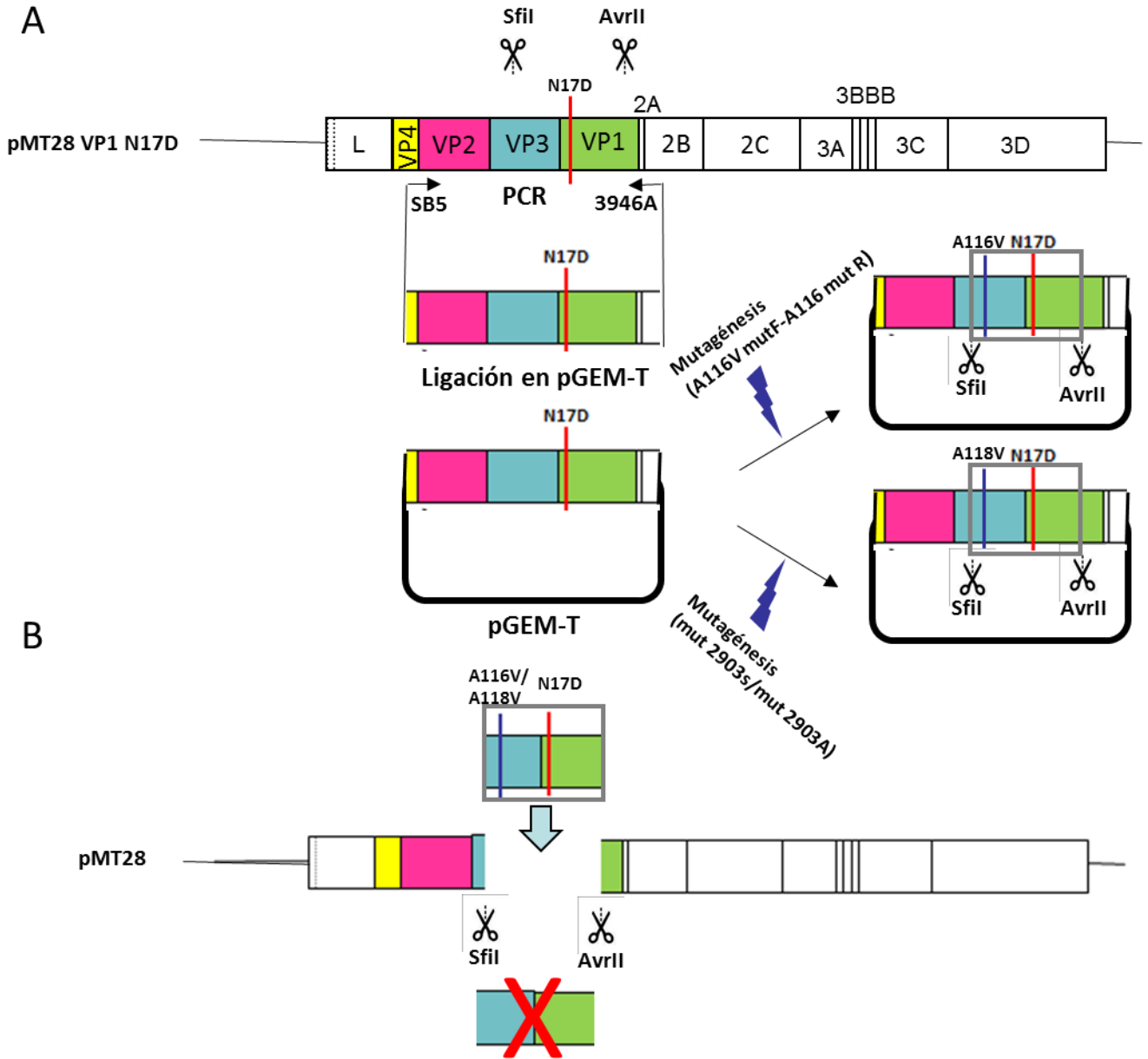


Figura 8. Esquema de la estrategia usada para la construcción de los clones infecciosos pMT28 VP3 A116V VP1 N17D y VP3 A118V VP1 N17D. A) En la parte superior, se representa el plásmido pMT28 N17D que se empleó como molde en la reacción de PCR (oligonucleótidos SB5-3946A) con sus dianas de restricción para las enzimas SfiI y AvrII. El producto de PCR, conteniendo el nucleótido mutado VP1 N17D, se ligó en plásmido pGEM-T y el plásmido se usó como molde en dos reacciones de PCR mutagénica, usando los oligonucleótidos indicados en la figura, en las que se introdujeron las nuevas mutaciones VP3 A116V y VP3 A118V. A continuación los plásmidos pGEM-T VP3 A116V VP1 N17D y pGEM-T VP3 A118V VP1 N17D se digirieron con SfiI y AvrII, generando los fragmentos mutados delimitados en los rectángulos de color gris. B) Los fragmentos resultantes de cada una de las digestiones (rectángulo gris), con las sustituciones VP3 A116V VP1 N17D o VP3 A118V VP1 N17D, se ligaron en el plásmido pMT28 digerido con las enzimas SfiI y AvrII. Con una X roja se indica el fragmento del pMT28 que es eliminado con la digestión para sustituirlo con el nuevo fragmento mutado proveniente de pGEM-T.

Tabla I. Oligonucleótidos cebadores utilizados

| Virus | Región^a | Cebador | Secuencia^b | Orientación^c | Posición^{d,e} | |
|--------------|---------------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------|
| VFA | 5'UTR | SB3 | TAAGTTTTACCGTCTGTCCCGACG | sentido | 368 | |
| | | 961s | AAGCGCTCGGTTTAAAAAGC | sentido | 961 | |
| | VP4 | SB5 | ACCTCTACACACAACCAACACC | sentido | 1804 | |
| | VP2 | 2310A | GTACTTTCCCTGTACTGATGTC | antisentido | 2310 | |
| | VP3 | A116-mutF | mut2903s | GGGCCGACCGACGTGAAAGCTCGGTACATGG | sentido | 2884 |
| | | | mut2903s | CGACCGACGCGAAAGTTCGGTACATGGTGGCG | sentido | 2888 |
| | | VP3-HSF | CGCGAAAGCTCGGTACATGGTGGCG | sentido | 2895 | |
| | | A116Vmut-R | CCATGTACCGAGCTTTCACGTGCGTGGGCC | antisentido | 2913 | |
| | | mut2903a | CGCCACCATGTACCGAACTTTCGGTGGTGGCG | antisentido | 2919 | |
| | VP3-HSR | 2B | VP3-HSR | CTAGCGTCCACAGGTAGCCGGAGC | antisentido | 3200 |
| | | | 3946A | GCATCTGGTTAATTGTCTCCACC | antisentido | 3946 |
| | | | 2C | 2CR2 | GGCAAACCTTCAGCAGTAAG | sentido |
| | 2CD3 | CGCTCACGTCGATGTCAAAGTG | | antisentido | 5047 | |
| VREA | L | ERAV1 FW | GAGGGTTGGATCTGTGTTGA | sentido | | |
| | VP2 | VP3 ERAV F | GGCCAACTGTGCCTGTGACCATG | sentido | 856 | |
| | | ERAV2 FW | CGATTAGAGTCTGTG | sentido | 935 | |
| | VP3 | ERAV1 RW | GCTTATCGGGCAGGTCAAC | antisentido | 1606 | |
| | VP1 | VP3 ERAV R | CATCTGGTGACGTGCATGTCCAC | antisentido | 1696 | |
| | 2A | ERAV2 RW | GCTCTCAACATCTCCAGCCA | antisentido | | |

^aRegión genómica de VFA o VREA a la que corresponde el oligonucleótido.

^bLa posición marcada en negrita indica el nucleótido mutado respecto a la secuencia correspondiente de C-S8c1.

^cOrientación del nucleótido iniciador: sentido significa de la misma polaridad que el RNA genómico del virus; antisentido significa de la polaridad complementaria al RNA genómico del virus.

^dPosición del primer nucleótido del cebador (dirección 5'-3') en el genoma de VFA (Gen Bank AJ13357.1), como se describe en Toja (Toja *et al.*, 1999).

^ePosición del primer nucleótido del cebador (dirección 5'-3') en la P1 de VREA (Gen Bank FJ607143), como se describe en Tuthill (Tuthill *et al.*, 2009).

La estrategia seguida para construir cada uno de los clones infecciosos se detalla a continuación:

- pMT28 VP3 A116V VP1 N17D y pMT28 VP3 A118V VP1 N17D. Se amplificó mediante PCR (apartado 4.11.2) la región incluida entre los nucleótidos 1804 y 3946 del genoma de C-S8c1 a partir de pMT28 N17D (Martín-Acebes *et al.*, 2011b), utilizando los cebadores SB5 y 3946A (Tabla I y Figura 8A). El fragmento de PCR generado fue subclonado en el vector pGEM-T (Promega), según las instrucciones del fabricante (Fig. 8A). Este vector intermedio, denominado pGEM VP1 N17D, se empleó como molde para llevar a cabo una mutagénesis dirigida usando el kit QuickChangeII (Agilent) (Fig. 8A), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, se usaron los cebadores A116mut-F/A116Vmut-R, que contienen el nucleótido mutado C2896T, para la introducir la mutación VP3 A116V y los cebadores

RESULTADOS

mut2903s/mut2903a, que contienen el nucleótido mutado C2903T, para introducir la mutación VP3 A118V (Tabla I). Los vectores intermedios pGEM A116V N17D y pGEM A118V N17D así generados se digirieron con las enzimas Sfil y AvrII (New England BioLabs) y la porción de plásmido incluida entre estas dianas (inserto) fue purificado mediante gel de agarosa. El vector pMT28 fue digerido con las mismas enzimas y tratado con fosfatasa alcalina (New England Biolabs) para evitar su religación. Después, el vector fue purificado de gel y ligado con el inserto utilizando la ligasa de DNA del bacteriófago T4 (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fig. 8B).

- pMT28 VP1 V111I, pMT28 VP1 T12A+N17D, pMT28 VP3 A116T+A118V VP1 N17D, VP3 A116V VP1 N17D+T22N. Para la construcción de estos clones se empleó RNA extraídos de cultivos infectados con las poblaciones virales WT N3 p10, N17D N1 p10, N17D N3 p10 y A116VN17D N1 p10, respectivamente (apartado 5.1.2). A partir del RNA viral, se obtuvieron los cDNA mediante una reacción de transcripción inversa, los cuales se amplificaron (apartado 4.11.2), utilizando los cebadores SB5 y 3946A (Tabla I). El DNA amplificado fue purificado y digerido con las enzimas de restricción Sfil y AvrII. Este inserto fue ligado con el vector pMT28 digerido con las mismas enzimas, como se indica en el párrafo anterior.
- pMT28 VP2 H145Y y pMT28 VP2 H145Y VP1 N17D. A partir del RNA extraído de un lisado celular del virus sr1 (apartado 5.3.1), se obtuvo el cDNA mediante una reacción de transcripción inversa y se amplificó (apartado 4.11.2), utilizando los cebadores SB3 y VP3-HSR. El fragmento de PCR generado fue subclonado en el vector pGEM-T, según las instrucciones del fabricante, y digerido con las enzimas de restricción HpaI y Sfil (New England BioLab) (Fig. 9A). El fragmento de interés fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y ligado en el vector pMT28, para generar el plásmido pMT28 VP2 H145Y, o en el vector pMT28 N17D, para generar el plásmido pMT28 VP2 H145Y VP1 N17D (Fig. 9B). En ambos casos, el vector pMT28 se había digerido previamente con las enzimas HpaI y Sfil, tratado con fosfatasa alcalina para evitar su religación y purificado mediante gel de agarosa.

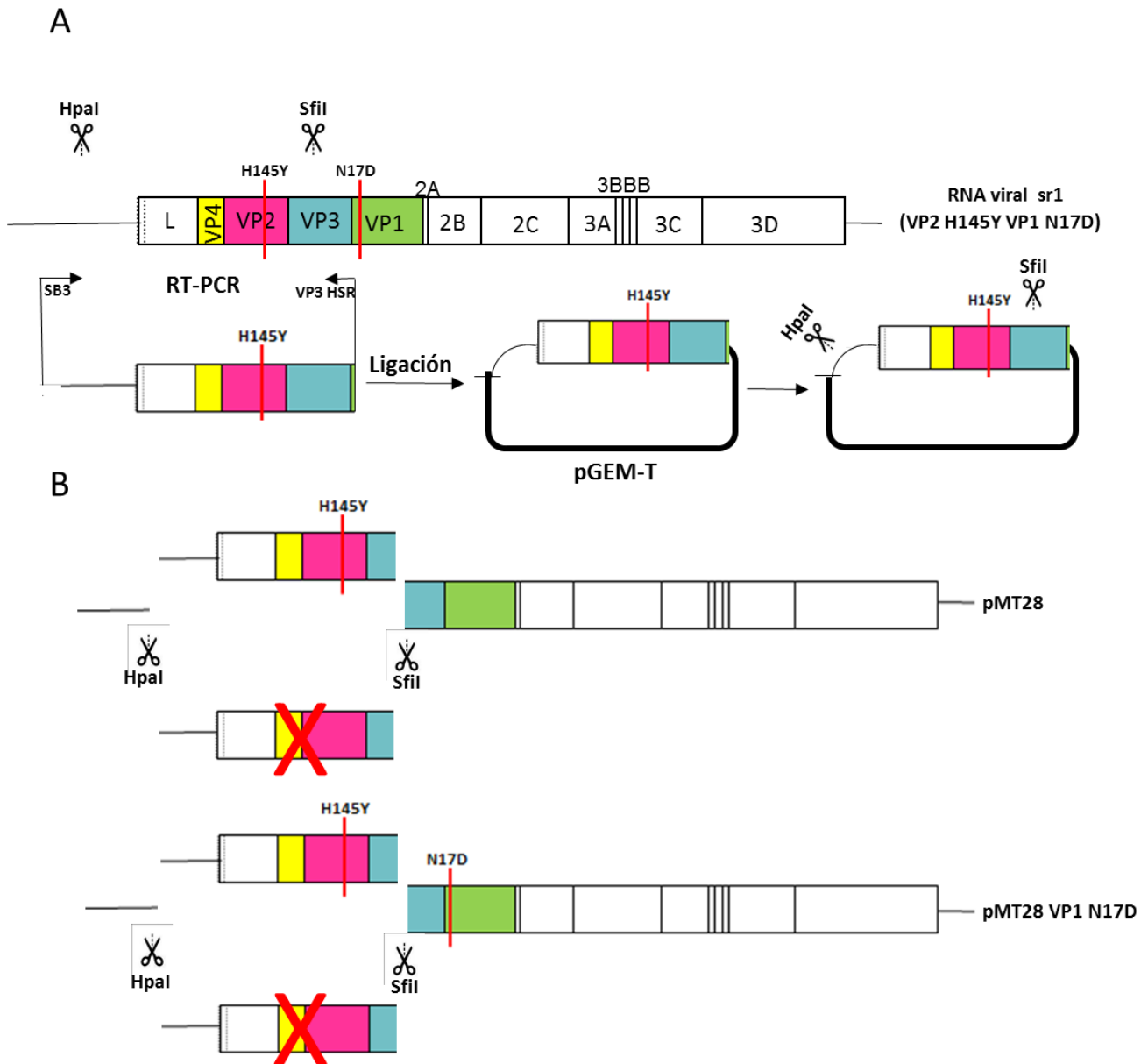


Figura 9. Esquema de la estrategia usada para la construcción de los clones infecciosos pMT28 VP2 H145Y y VP2 H145Y VP1 N17D. A) En la parte superior, se representa el RNA extraído de un lisado celular del virus sr1 que se empleó como molde en la reacción de RT-PCR (oligonucleótidos SB3-VP3-HSR) con sus dianas de restricción para las enzimas HpaI y SfiI. El producto de RT-PCR, conteniendo el nucleótido mutado VP2 H145Y, se ligó en plásmido pGEM-T, que a continuación se digirió con las enzimas HpaI y SfiI. B) El fragmento resultante de la digestión se ligó con el plásmido pMT28 o pMT28 VP1 N17D, previamente digeridos con HpaI y SfiI, para construir los plásmidos mutados pMT28 VP2 H145Y y pMT28 VP2 H145Y VP1 N17D, respectivamente. Con una X roja se indica el fragmento del pMT28 que es eliminado con la digestión para substituirlo con el nuevo fragmento mutado proveniente del pGEM-T.

Con los productos de las diferentes ligaciones se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α (Inoue *et al.*, 1990), preparadas en el Servicio de Fermentación del CBMSO. Las bacterias fueron sembradas en placas de agar con medio LB (Luria y Burrous, 1957) suplementado con 100 μ g/ml

RESULTADOS

ampicilina (Boheringer Mangheim). Para los clonajes en pGEM-T, las placas de LB + ampicilina se suplementaron con X-Gal y IPTG para permitir la selección de las colonias con inserto, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las colonias de bacterias capaces de crecer fueron inoculadas y propagadas en medio líquido (LB con 50 µg/ml ampicilina). Los plásmidos resultantes de la amplificación en *E. coli* fueron purificados con el Plasmid Maxi Kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia nucleotídica de la región de los diferentes plásmidos que codifica las proteínas de la cápsida de VFA (P1) fue confirmada mediante secuenciación de DNA (apartado 4.11.4).

4.7 Transcripción *in vitro* de plásmidos

Se empleó como molde DNA de los diferentes clones infecciosos derivados de pMT28, descritos en el apartado 4.3. El DNA fue linealizado mediante digestión con la enzima de restricción NdeI (New England Biolabs) y purificado utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA fue transcrito a partir de 500 ng de molde linealizado utilizando la RNA polimerasa del bacteriófago SP6 (New England BioLabs) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA molde fue eliminado por digestión con la nucleasa de DNA RQ1 (Promega). La integridad del RNA sintetizado se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

4.8 Transfección de RNA viral

Las células BHK-21 subconfluentes (70% de confluencia) crecidas en placas de 35 mm de diámetro fueron transfectadas con 5 µl de RNA procedente de la transcripción *in vitro* (apartado anterior) utilizando Lipofectin Reagent (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El virus recuperado de la transfección (48-72 h post-transfección) fue amplificado mediante una o dos infecciones en medio líquido en células BHK-21, excepto en los experimentos en los que se empleó sobrenadante de transfección (sin pases adicionales). La identidad de la región P1 del virus recuperado fue comprobada mediante extracción de RNA del sobrenadante de infección (apartado 4.11.1) y su secuenciación (apartado 4.11.4).

4.9 Aislamiento de mutantes de VFA y VREA

Para aislar mutantes de VFA y VREA con diferentes grados de sensibilidad a pH ácido se siguieron dos abordajes diferentes: clonajes biológicos (apartado 4.9.1) o pases seriados (apartado 4.9.2).

4.9.1 Clonajes biológicos

4.9.1.1 Aislamiento de un mutante de VFA con resistencia a pH ácido incrementada (mutante sr1)

El mutante de VFA con resistencia a pH ácido incrementada, aislado y caracterizado durante esta Tesis Doctoral, se seleccionó a partir del virus m6, un mutante de VFA más estable que el virus parental, que había sido previamente descrito (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Este nuevo mutante, con resistencia a pH ácido incrementada con respecto al virus m6, se aisló mediante clonaje biológico (apartado 4.5.2.2), siguiendo una modificación del protocolo descrito (Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Twomey *et al.*, 1995). En primer lugar se incubaron 10^6 UFP de virus m6 (en 50 μ l) con 300 μ l de tampón salino fosfato pH 5.2 (50 mM NaPO₄ y 140 mM NaCl). Transcurridos 30 min a t.a., el pH fue neutralizado añadiendo 100 μ l de tampón Tris 1 M pH 7.6. Las muestras así preparadas se utilizaron para infectar monocapas subconfluentes de células BHK-21 crecidas en placas de 35 mm de diámetro. Tras 30 h de infección en medio semisólido (apartado 4.5.2.1) se seleccionaron diferentes placas de lisis que fueron amplificadas mediante infección en medio líquido (primer pase). Los virus de este primer pase fueron amplificados mediante dos pases adicionales previo tratamiento con pH 5.2 (segundo y tercer pase) (Fig. 10). Una de las poblaciones virales, denominada sr1, mostró resistencia a pH ácido (apartado 5.3.1).

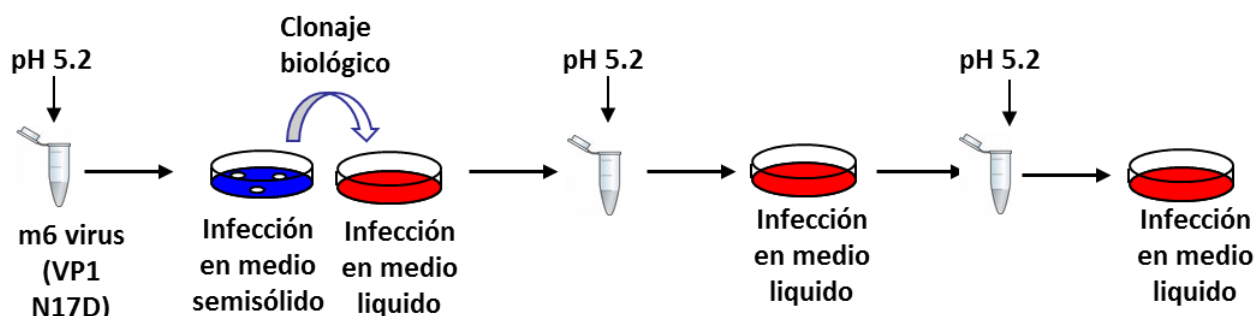


Figura 10. Esquema de la estrategia usada para el aislamiento del mutante de VFA serotipo C resistente a pH ácido. Para una explicación detallada, consultar el texto (apartados 4.9.1.1 y 5.3.1).

4.9.1.2 Aislamiento de mutantes de VFA de serotipo O resistentes a NH₄Cl

Los mutantes de VFA resistentes a NH₄Cl fueron seleccionados en presencia de 25 mM de NH₄Cl mediante clonaje biológico (apartado 4.5.2.2). Para ello, se infectaron células BHK-21, crecidas en placas de 35 mm de diámetro, con diluciones seriadas de VFA O₁K. Tras la primera hora de infección, se retiró el inóculo viral y se añadió medio semisólido suplementado con 25 mM HEPES pH 7.4 y 25 mM NH₄Cl (apartado 4.5.2.1). Tras 30 h de infección, se seleccionaron diferentes placas de lisis y los

RESULTADOS

virus contenidos se amplificaron en medio líquido mediante dos pases seriados en células BHK-21. A continuación se procedió como se describe en el apartado 5.1.4.

4.9.1.3 Aislamiento de mutantes de VREA resistentes a NH_4Cl

Los mutantes de VREA resistentes a NH_4Cl fueron seleccionados mediante clonaje biológico (apartado 4.5.2.2) en presencia de 10 mM NH_4Cl . Para ello, se infectaron células Vero con diluciones seriadas de VREA. El procedimiento fue similar al descrito en el apartado anterior para VFA de tipo O, solo que, en este caso, el NH_4Cl se utilizó a una concentración de 10 mM y las placas de lisis se seleccionaron a las 72 h post-infección, así como se describe en el apartado 5.4.1.

4.9.2 Pases seriados

4.9.2.1 Selección de mutantes de VFA mediante pases en presencia de NH_4Cl

El protocolo para la infección en medio líquido y el tratamiento con NH_4Cl se ha descrito en el apartado 4.5.1. Para los pases en presencia de NH_4Cl , 10^6 UFP de virus recuperado de los clones infecciosos pMT28, pMT28 VP1 N17D y pMT28 VP3 A116V VP1 N17D se emplearon para infectar monocapas confluentes de células BHK-21 crecidas en placas M-24, pretratadas con 25 mM NH_4Cl . Tras la primera hora de infección se retiró el inóculo y se añadió medio nuevo conteniendo 25 mM NH_4Cl . Cuando se observó efecto citopático evidente, la placa, conteniendo las células infectadas y el sobrenadante de infección, se sometió a un ciclo de congelación y descongelación para obtener el virus total. 150 μl de la suspensión viral recuperada ($\sim 1/6$ del volumen total) se utilizó para infectar células BHK-21 en presencia de 25 mM NH_4Cl , repitiendo el proceso. El ciclo de infección y recolección de los virus se repitió hasta 10 veces por triplicado. Finalmente se extrajo el RNA viral de los virus recuperados del último pase (pase 10), obteniéndose el cDNA correspondiente a la región P1 que fue secuenciado (apartado 4.11.4). En los casos en que no se encontraron mutaciones con respecto a la secuencia consenso de C-S8c1, el ciclo de infección y recolección se repitió hasta un total de 20 veces.

4.9.2.2 Selección de mutantes de VREA previo tratamiento con pH ácido

El protocolo utilizado fue una modificación del descrito por Martin-Acebes et al., (2011) y Twomey et al., (1995) para VFA. Primero se incubaron 10^6 UFP de VREA (en 100 μl) con 300 μl de tampón salino fosfato pH 5.0 (50 mM NaPO_4 y 140 mM NaCl). Transcurrida 1 hora a t.a. el pH fue neutralizado añadiendo 100 μl de tampón Tris 1M pH 7.6. A continuación se emplearon 200 μl de las muestras para infectar monocapas confluentes de células Vero crecidas en placas de 35 mm de diámetro, recogiendo el virus total mediante congelación y descongelación de las placas cuando se observó un efecto citopático evidente. Posteriormente, 100 μl de los virus recuperados se trataron

nuevamente con tampón salino fosfato pH 5.0, como anteriormente. El ciclo de infección y recolección de los virus se repitió hasta 10 veces por duplicado.

4.10 Amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos

4.10.1 Extracción de RNA viral

El RNA viral fue extraído a partir de 100 µl de sobrenadante de cultivo infectado, utilizando TRI Reagent (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA se resuspendió en 10 µl de H₂O tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) y fue almacenado a -70 °C hasta su utilización.

4.10.2 Obtención de cDNA y amplificación de DNA mediante RT-PCR y PCR

El RNA viral fue amplificado mediante retrotranscripción seguida de amplificación por PCR (RT-PCR). Para la reacción de retrotranscripción del RNA vírico, se empleó la transcriptasa inversa MuLV del virus de la leucemia Moloney de ratón (Roche). El cDNA fue amplificado mediante PCR utilizando la DNA polimerasa Bio-taq (Bioline), mezclada (10% v/v) con la polimerasa Expanded High Fidelity (Roche), que presenta actividad correctora de errores. El proceso de amplificación por RT-PCR se realizó en un solo paso, utilizando las condiciones de reacción que se indican en la Tabla II. En el caso de partir de un molde de DNA (plásmido), se omitió la amplificación con retrotranscripción (Tabla II), manteniéndose los restantes pasos. Todos los oligonucleótidos utilizados en la reacción de RT-PCR y PCR se indican en la Tabla I. Para la amplificación completa de la región P1 de los genomas de VFA y VREA se realizaron dos reacciones de RT-PCR o PCR solapantes. Para VFA, en la primera se emplearon los cebadores 961s y 2310A y en la segunda los cebadores SB5 y 3946A (Tabla I). Para VREA, en la primera se utilizaron los cebadores ERAV1 FW y ERAV1 RW y en la segunda los cebadores ERAV2 FW y ERAV2 RW (Tabla I). El tamaño y la pureza de los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

Tabla II. Programa de RT-PCR para amplificar cDNA viral.

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo (min : seg) | Ciclos (n.) |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------|
| Retrotranscripción | 48 | 50:00 | 1 |
| Desnaturalización inicial | 94 | 02:00 | 1 |
| Desnaturalización | 94 | 00:45 | |
| Anillamiento | 40 | 02:00 | 40 |
| Extensión | 72 | 02:00 | |
| Extensión final | 72 | 07:00 | 1 |
| Fin de la reacción | 4 -10 | ∞ | 1 |

El símbolo ∞ indica un periodo de tiempo indefinido (desde pocos minutos a un día).

RESULTADOS

4.10.3 Purificación y cuantificación de productos de PCR

El exceso de oligonucleótidos cebadores fue eliminado utilizando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de DNA se realizó mediante espectrofotometría UV, utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

4.10.4 Secuenciación de DNA

La secuenciación de nucleótidos fue realizada por Macrogen (Holanda). El análisis de secuencias se llevó a cabo con el paquete de DNA Star (Lasergene 8.0) mediante el análisis de cromatogramas. Cada secuencia se determinó con al menos dos reacciones independientes de secuenciación. Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación de DNA se detallan en la Tabla I.

4.10.5 Cuantificación de moléculas de RNA vírico mediante RT-PCR en tiempo real

La cuantificación de RNA vírico se realizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real con el equipo LightCycler (Roche). Este método permitió medir el RNA amplificado en cada ciclo de la reacción de PCR mediante una sonda fluorescente (SYBR Green I). Se utilizó el kit Light Cycler RNA Master SYBR Green I (Roche) y se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante, optimizando la concentración de Mn^{++} a 3 mM. La región amplificada para la cuantificación de RNA vírico fue la correspondiente a la proteína viral 2C y los oligonucleótidos empleados fueron 2CD3 y 2CR2 (Hernández, 2014) (Tabla I). El RNA de las muestras se cuantificó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón realizada en paralelo con RNA transcrito a partir del plásmido pMT28 (apartado 4.3), cuya concentración había sido determinada por su absorbancia a 260 nm y confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.11 Experimentos de competición viral

La misma cantidad de UFP de los virus recuperados a partir de los clones infecciosos pMT28 y pMT28 VP3 A116V VP1 N17D se usaron para infectar células BHK-21 a una m.d.i. inicial de 0.1 UFP/célula (0.05 para cada virus). Para ello se emplearon células BHK-21 crecidas en placas de 35 mm de diámetro tratadas o no con 25 mM de NH_4Cl . Tras la primera hora de infección se retiró el inoculo y se añadió medio nuevo conteniendo o no 25 mM NH_4Cl . Cuando se observó efecto citopático, se recogió el sobrenadante de infección junto con las células (virus total), empleándose 200 μ l de la suspensión viral recuperada para volver a infectar células BHK-21. El ciclo de infección y recolección de los virus se repitió hasta 10 veces por triplicado en presencia o ausencia de NH_4Cl . A continuación se extrajo el RNA viral (apartado 4.11.1) de los virus recuperados de los diferentes países, y el cDNA

correspondiente a la región P1 fue sintetizado y secuenciado (apartado 4.11.4). La proporción de los genomas que competían fue estimada a partir de los cromatogramas obtenidos, como la relación de la área integrada correspondiente a cada nucleótido en las dos posiciones de las mutaciones puntuales analizadas (C2897T y A3256G).

4.12 Purificación de partículas de VFA

Los virus de interés se emplearon para infectar en medio líquido (apartado 4.5.1) 4 botellas de 175 cm² (Nunc) de células BHK-21 con una m. d. i. >1, hasta la aparición de efecto citopático completo. El sobrenadante de la infección fue centrifugado 10 min a 690 x g y, a continuación, 20 min a 9700 x g. Los viriones fueron parcialmente purificados mediante ultracentrifugación en un colchón de sacarosa al 20% en TNE durante 2.5 h a 112 400 x g. El sedimento resultante fue resuspendido en TNE, cargado en un gradiente lineal de sacarosa (7.5 al 30%) en TNE y centrifugado durante 1 h a 242 800 x g. Se recogieron fracciones de 1 ml y la cantidad de proteína viral presente en cada una de ellas fue determinada mediante *dot blot* (apartado 4.14.2). Las fracciones que contenían la mayor cantidad de viriones fueron recuperadas y sometida a diálisis frente a PBS durante 12 h (utilizando membranas de Dialysis Tubing-Visking MWCO 12-14 000 Da, Medicell Internacional) para eliminar la sacarosa. Los viriones purificados fueron almacenados a 4 °C hasta su posterior uso.

4.13 Determinación de la sensibilidad diferencial a pH ácido

4.13.1 Ensayo de disociación de la cápsida viral

La sensibilidad diferencial a pH ácido de los viriones de VFA recuperados a partir de los clones infecciosos pMT28, pMT28 VP1 N17D y pMT28 VP2 H145Y VP1 N17D, se determinó mediante una modificación del método descrito por Knipe *et al.*, (1997). Para ello, se mezclaron 100 µl de VFA purificado (apartado 4.12) con 300 µl de tampón salino fosfato (50 mM NaPO₄ y 140 mM NaCl) de distinto pH (7.4 o 6.0). Tras una incubación de 30 min a t.a, el pH fue neutralizado añadiendo 100 µl de tampón Tris 1 M pH 7.6. Para determinar la integridad del virus tras las incubaciones con distinto pH, las muestras fueron cargadas en un gradiente lineal de sacarosa del 7.5% al 45% en tampón TNE, que fue centrifugado a 41 500 x g durante 18 h y fraccionado en alícuotas de 1 ml. La cantidad de proteína viral en cada fracción fue determinada mediante *dot blot* (apartado 4.14.2).

4.13.2 Ensayo de inactivación

La sensibilidad a la inactivación por pH ácido de los viriones de VFA y VREA se determinó tratando alrededor de 10⁵ UFP de cada virus (en 50 o 100 µl) con 300 µl de tampón salino fosfato. Tras 30 min a t.a., el pH de la muestras fue neutralizado añadiendo 100 µl de tampón Tris 1 M pH 7.6. A

RESULTADOS

continuación, las muestras fueron inoculadas en monocapas subconfluentes de células BHK-21 o Vero, en medio semisólido, determinándose tras 24-30 h (VFA) o 48-60 h (VREA) de infección el número de UFP desarrolladas.

4.14 Métodos usados para la detección de proteínas virales en muestras de VFA purificado

4.14.1 Western blot

Para el análisis de las proteínas virales y sus precursores de los virus C-S8c1, m6 y sr1, la fracción de virus purificado que contenía el pico de viriones fue dializada durante 1 h. La misma cantidad de proteína total de cada muestra, determinada mediante Nanodrop, se mezcló con tampón de carga de Laemmli (Laemmli, 1970) y se calentó a 100 °C durante 2 min. Las proteínas se separaron electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Para ello, se utilizaron geles discontinuos de poliacrilamida compuestos por un gel concentrador con 5% de poliacrilamida (BioRad), seguido por un gel separador con 12% de poliacrilamida. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Protran, Whatman) que se bloquearon con 3% leche desnatada (Sveltesse) en PBS durante 45 min, lavándose a continuación durante 5 min con PBS-Tween (0.05% Tween20 en PBS) tres veces. Para la detección de las proteínas virales, las membranas se incubaron durante 1 h a t.a. con anticuerpos monoclonales anti-VP1 (SD6), anti-VP2 (4A3), anti-VP3 (6C2) (Goodwin *et al.*, 2009; Mateu *et al.*, 1987) diluidos en PBS-BSA (1% BSA en PBS). Tras tres lavados de 10 min con PBS-Tween la membrana se incubó con los anticuerpos secundarios apropiados acoplados a peroxidasa (Thermo Scientific, Pierce) durante 1 h diluidos en PBS-BSA. Finalmente, la membrana fue lavada tres veces con PBS-Tween (10 min) y revelada mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo Western Lightning Plus-ECL (Perkin-Elmer) y un equipo Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare).

4.14.2 Dot blot

Para determinar la cantidad de viriones presente en cada una de las fracciones de virus purificado, después de su almacenamiento a 4 °C, o después del ensayo de disociación, se recogieron 25 µl de cada fracción a los que se añadieron 75 µl de PBS. Las muestras se inactivaron por incubación a 70 °C durante 30 min y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatmann), prelavada con PBS, usando un aparato Bio-Dot (BioRad) y filtración por vacío. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con 3% de leche desnatada en PBS durante 45 min y lavada 3 veces con PBS-Tween durante 5 min. La membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-VP1 SD6 diluido en 1% BSA en PBS durante 1 h a t.a. o, alternativamente, durante toda la noche a 4 °C. A continuación, la

membrana se lavó con PBS-Tween y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Thermo Scientific, Pierce). Finalmente, la membrana fue lavada de nuevo tres veces con PBS-Tween (cada 10 min) y revelada utilizando el reactivo Western Lightning Plus-ECL y el equipo Image Quant LAS 4000. La cantidad de VP1 presente en cada fracción se determinó con el programa Image J 1.49v (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

4.14.2.1 Análisis de la especificidad antigénica de mutantes de VFA

El análisis de la especificidad antigénica de los mutantes de VFA se realizó según lo descrito previamente (Rincón, 2012). Para ello, los virus recuperados de los clones infecciosos pMT28, pMT28-VP1 N17D, pMT28 VP2 H145Y VP1 N17D y pMT28 VP2 H145Y se purificaron (apartado 4.12) y dializaron. A continuación, las muestras conteniendo la misma cantidad de proteína (determinada mediante espectrofotometría UV a 280 nm) se transfirieron, mediante adsorción con presión atmosférica (para no comprometer la integridad de la partícula), a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatmann) pre-lavada durante 1 h con PBS, usando un aparato Bio-Dot. A continuación, se procedió como en el apartado anterior. El panel de anticuerpos monoclonales representativos de los diferentes sitios antigénicos de VFA C-S8c1, empleando los anticuerpos SD6 (sitio A), 7JA1 (sitio C) y 1G5, 2E5 y 5C4 (subsitos D1, D2 y D3, respectivamente) (Mateo *et al.*, 2008).

4.15 Obtención de células dendríticas porcinas

4.15.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Para aislar las PBMC, se extrajo sangre de cerdos (apartado 4.4), que se fraccionó utilizando un protocolo previamente descrito (McCullough *et al.*, 1993). Para ello, 400 ml de sangre diluida con 200 ml de Alsever (Sigma), se centrifugaron durante 20 min a 4 °C y a 1 000 x g. Se recogió el *buffy coat* (capa leucocitaria) que fue diluido en el mismo volumen de PBS-EDTA, precalentado a t.a. Las PBMC se aislaron usando el reactivo Ficoll-Paque (Pharmacia AG) en tubos Falcon de 50 ml (Leucosep), que fueron centrifugados a 400 x g durante 30 min a t.a. (10-15 ml Ficoll Paque para 5-10 ml de *buffy coat*). Las PBMC se lavaron con PBS-EDTA a 4 °C y se centrifugaron a 300 x g durante 10 min a 4 °C y a continuación dos veces a 250 x g en las mismas condiciones. Finalmente, el pellet se resuspendió en 5 ml de PBS-EDTA. La cantidad de PBMC se calculó usando una cámara de Neubauer y solución diluyente de Turk (2% ácido acético glacial, 0.01% cristal violeta en H₂O) según las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

4.15.2 Enriquecimiento en células dendríticas plasmacitoides (pCDs)

Para el enriquecimiento en pCD se usó un equipo MACS (*magnetic activated cell sorting*), el anticuerpo anti-CD172a (SWC3) clone: 74-22-15A (VMRD INC.) y columnas LD (Miltenyi Biotec GmbH).

Las PBMC (apartado 4.15.1) se centrifugaron durante 10 min a 250 x g (4 °C) y se resuspendieron en 700 µl de tampón MACS (PBS-EDTA, 1% FBS) a 4 °C conteniendo el anticuerpo SWC3 (1 µl/10⁶ de células). Tras 20 min de incubación en hielo, las suspensiones se lavaron con PBS-EDTA y se centrifugaron 10 min a 250 x g (4 °C), descartándose el sobrenadante. El sedimento recuperado se incubó con microsferas magnéticas anti IgG diluidas en tampón MACS (20 µl de microsferas + 80 µl de tampón MACS/10⁷ células) durante 15 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se lavó la suspensión celular con PBS-EDTA frío, se centrifugó durante 10 min a 250 x g (4 °C). Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de tampón MACS. La muestra se pasó a través de la columna LD, previamente equilibrada con 3 ml del mismo tampón e insertada en el soporte magnético según las instrucciones del fabricante. Las células unidas a la columna se lavaron con 4 ml de tampón MACS y se eluyeron en 2 ml de este tampón, aplicando presión con el embolo de la columna. El número de células totales CD172+ obtenido tras la elución se determinó usando una cámara de Neubauer y solución diluyente de Turk, según las instrucciones del fabricante. Las células se mantuvieron en DMEM plus GlutaMax-I (Gibco) suplementado con 20 µM de β-mercaptoetanol durante 1 h a 39 °C en una atmosfera con un 6 % de CO₂, procediéndose a su infección o estimulación (apartado siguiente).

4.16 Infección y estimulación de células dendríticas porcinas

La infección y estimulación de las pCD se llevaron a cabo como se describe en (Guzylack-Piriou *et al.*, 2006), utilizando pocillos de M-96 con fondo cónico, para facilitar la recogida del sobrenadante. En ambos casos, se empleó una m. d. i. de 0.5 UFP/ml y 5 x 10⁵ células de partida para cada experimento. En el caso de las infecciones con los virus C-S8c1 y sr1, para facilitar la entrada del virus en las CD, la adsorción se hizo en presencia de 10% de suero inmune de un cerdo infectado con VFA. Primero, las células CD172+ se centrifugaron durante 10 min a 350 x g y 4 °C y el sobrenadante se descartó, añadiéndose la mezcla de virus y suero a las células (volumen final de 100 µl). Tras un periodo de adsorción de 4 horas a 39 °C, las muestras se centrifugaron a t.a. durante 10 min a 350 x g, el sobrenadante se retiró y las células sedimentadas se lavaron 4 veces con DMEM para eliminar el virus no adsorbido. Tras los lavados, se añadió DMEM plus Glutamax (Gibco) con 5% SFB, considerándose

este momento como tiempo 0 h p. i. Tras 14 horas a 39 °C, se detectó la expresión de los antígenos virales mediante citometría de flujo (apartado 4.19). Para la estimulación de las células dendríticas, se añadieron 100 µl de suspensión viral (sin SFB ni suero inmune) a un volumen de 50 µl de células CD172+. Los sobrenadantes se recogieron a 16, 24 y 40 h post-estimulación y se almacenaron a -20 °C hasta la determinación del contenido en IFN-α (apartado 4.17).

4.17 Detección de IFN-α en sobrenadantes

El IFN-α producido por las células dendríticas porcinas estimuladas con el virus C-S8c1, m6 y sr1 se cuantificó empleando un ELISA en formato sándwich y el sistema de detección estreptavidina-biotina (Guzylack-Piriou *et al.*, 2004). Primero, se tapizaron placas de 96 pocillos (Maxisorp Nunc) con 100 µl de anticuerpo monoclonal anti IFN-α porcino K9 (10 µg/ml, R&D systems) diluido en PBS (1:10 000) durante toda la noche a t.a. Tras lavar con 0.05% PBS-Tween (5 veces), los pocillos se incubaron con 100 µl de una solución de saturación (0.5% BSA en PBS-Tween) durante 1 h a 37 °C. Después, las placas se lavaron nuevamente con PBS-Tween (5 veces), se incubaron con las muestras de interés diluidas 1:2 con la solución de saturación durante 3 h a 37 °C. A continuación, se lavaron con PBS-Tween, incubándose con 100 µl del anticuerpo biotinilado anti IFN-α F17 (10 µg/ml, R&D systems), diluido en la solución de saturación durante 2 h a t.a. Tras 5 lavados con PBS-Tween (5 veces), las muestras se incubaron con streptavidina acoplada a peroxidasa (Dako), 20 min a 37 °C, se lavaron nuevamente con PBS-Tween y se añadió el sustrato O-fenilene- diamina (OPD, Sigma), según las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió a 450 nm. Los valores de producción de IFN-α se obtuvieron extrapolándolos de una curva generada por patrones de cantidades conocidas de esta citoquina.

4.18 Citometría de flujo

Para detectar la expresión de los antígenos virales, se llevó a cabo una tinción intracelular. Las células se recogieron en tubos para citometría de flujo (Becton Dickinson) y se lavaron con 1 ml de *Cell Wash* (Becton Dickinson) a 4 °C. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 5 min a 400 x g, se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de una solución de 4% PFA en PBS. Tras 10 min a t.a., las células se permeabilizaron añadiendo 1 ml de una solución de 0,1% saponina en PBS. Las muestras se centrifugaron de nuevo y se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en 0.3% saponina en PBS. Como anticuerpos primarios se utilizaron los anticuerpos monoclonales de ratón SD6 anti-VP1 (Mateu *et al.*, 1989) y 2C2 anti-3A (De Diego *et al.*, 1997). Las muestras se incubaron 20 min en hielo, se lavaron con 0.1% saponina en PBS, se centrifugaron y el sobrenadante se descartó.

RESULTADOS

A continuación, se añadieron los anticuerpos secundarios específicos de isotipo conjugados con fluorocromos diluidos en 0.3% saponina y, tras 15 min de incubación en oscuridad y en hielo, las muestras se lavaron con 1 ml de 0.1% saponina. Finalmente, el sobrenadante se retiró, las células se resuspendieron en 100 μ l de *Cell Wash* y se analizaron con un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson). Los datos se procesaron usando el programa Flowjo (www.flowjo.com/).

4.19 Vacunación de cerdos con partículas inactivadas de VFA

4.19.1 Producción y purificación del virus inactivado

Con los virus recuperados de los clones infecciosos pMT28 y pMT28 VP2 H145Y VP1 N17D, se infectaron en medio líquido (apartado 4.5.1) 10 botellas de 175 cm² de células BHK-21 con una m.d.i. >1, hasta observar efecto citopático completo.

Las suspensiones virales se inactivaron utilizando etilanimina binaria (BEI) (Bahnemann, 1975). Este compuesto se preparó a partir de una disolución 0.1 M de 2-bromoetilamina hidrobromuro (BEA) en 7% NaOH a la que se añadieron 0.05 ml/l de 1% β -naftol, como indicador. La disolución fue calentada a 37 °C con agitación periódica, hasta observar un cambio de color de violeta a naranja, indicativo de la conversión de BEA a BEI. Una vez esterilizada por filtración (0.22 μ m de tamaño de poro), esta disolución de BEI se añadió a la suspensión viral (3% v/v), incubándose con agitación durante 24 h a t.a. Entre las 15 y 18 h del inicio de la incubación, la mezcla se cambió de recipiente para evitar que partículas de virus fuera de la suspensión contaminasen el antígeno inactivado. Una vez transcurridas 24 h, la BEI residual en la suspensión de virus se hidrolizó añadiendo un 2% de una disolución 1 M de tiosulfato de sodio (Na₂SO₃). La eficacia de la inactivación se verificó mediante inoculación en medio líquido de células BHK-21, dándose tres pases (pases ciegos) al sobrenadante inicial; en ningún caso se observó indicios de efecto citopático. Tras la inactivación, las suspensiones virales se purificaron, como se describe en el apartado 4.13, omitiendo el paso de diálisis. La inocuidad del antígeno concentrado fue nuevamente verificada mediante su inoculación en células BHK-21 en medio líquido. La concentración del antígeno viral en la fracción que contenía el pico de viriones se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) (Mateo, 2004).

4.19.2 Inmunización de animales y recogida de muestras de sangre

Se inocularon cerdos por vía intramuscular (apartado 4.3) con dos dosis de 10 μ g de virus inactivado emulsionado con un 15% de adyuvante Montanide ISA 25VG en PBS, administradas con un intervalo de 30 días.

Antes de la primera inmunización se tomaron muestras de sangre del animal, considerándose este momento como tiempo 0 (suero pre-inmune). Se recogieron muestras de sangre (10-20 ml) a intervalos de tiempo de aproximadamente 7 días durante toda la duración del experimento. Las muestras se incubaron 1 h a 37 °C y 1 h a 4 °C, centrifugándose a continuación durante 30 min a 4 °C y 1000 x g. El sobrenadante (suero) obtenido se congeló a -20 °C hasta su posterior uso.

4.19.3 Seroneutralización

La determinación de los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero se realizó siguiendo el protocolo estándar para ensayos de microneutralización en placas de 96 pocillos (OIE, 2015a). Primero, los sueros a ensayar se inactivaron a 56 °C durante 30 min. A continuación, se realizaron diluciones seriadas en base dos de los sueros y éstas se incubaron con 100 TCID₅₀ de VFA (recuperado del clon infeccioso pMT28) durante 1 h a temperatura ambiente. La actividad viral presente en dichas mezclas se determinó tras la adición de células BHK-21. Los títulos se calcularon como el logaritmo en base 10 del recíproco de la dilución final de suero (en la mezcla con el virus) capaz de neutralizar las 100 TCID₅₀ del virus en el 50% de los pocillos, impidiendo la aparición del efecto citopático (OIE, 2015a).

4.19.4 Detección de anticuerpos específicos contra VFA

4.19.4.1 Anticuerpos específicos totales

Para la determinación de anticuerpos específicos frente a VFA se utilizó un ELISA en formato sándwich (Borrego *et al.*, 2013). Se tapizaron placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) con suero policlonal de conejo anti-VFA de serotipo C (IAH, Pirbright, UK), diluido en tampón carbonato/bicarbonato durante toda la noche a t.a. A continuación, los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Tween y se incubaron con una suspensión de virus inactivado diluido 1: 2 en tampón 1 (2% leche en polvo descremada en PBS Tween) durante 1 h a 37 °C. El virus inactivado fue preparado a partir de sobrenadante de células BHK-21 infectadas con C-S8c1 y con el título aproximado de 1x10⁷ UFP antes de la inactivación. Tras retirar la suspensión viral, los pocillos se lavaron nuevamente con PBS-Tween (3 veces) y se tapizaron con diluciones seriadas en base dos de los sueros en tampón 1, partiendo de la dilución 1:50 hasta llegar a la dilución 1:3200. Tras 1 h de incubación a 37 °C, los pocillos se lavaron con PBS-Tween (3 veces) y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Dako Cytometer) durante 1 h a 37 °C en tampón 2 (2% leche en polvo descremada en PBS, 2% suero de conejo, 10% SFB en PBS-Tween). Finalmente, el sobrenadante se descartó y, tras 3 lavados con PBS-Tween, se añadió a los pocillos el sustrato TMB T4444 (Sigma), según las

RESULTADOS

instrucciones del fabricante. Transcurridos 10 min, la reacción se paró añadiendo una solución 1 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y la absorbancia se midió a 450 nm. El título de anticuerpos se determinó como la última dilución que dio un valor de OD 3 veces mayor que el observado con el tampón 1 (fondo).

4.19.4.2 Isotipado de los anticuerpos frente a VFA

El isotipo (IgG1, IgG2, IgM y IgA) de los anticuerpos específicos frente al VFA se determinó utilizando una modificación del ELISA indirecto doble sándwich descrito por (Salt *et al.*, 1996). Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos (Maxisorp) con suero policlonal de conejo anti-VFA de serotipo C (IAH, Pirbright, Reino Unido). Tras cuatro lavados con PBS-Tween, se añadió una solución de saturación (2% leche en polvo descremada en PBS) y las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C. Los pocillos se lavaron una vez con PBS-Tween, se incubaron con antígeno viral inactivado (preparado como se describe en el apartado anterior) en solución de bloqueo durante 1 h a 37 °C. A continuación el virus se retiró, los pocillos se lavaron con PBS-Tween (4 veces) y se tapizaron con diluciones seriadas en base dos de los sueros en tampón 1 (apartado 4.19.4.1), partiendo de la dilución 1:50 (IgG1, IgG2, IgA) o 1:100 (IgM). Tras una hora de incubación a 37 °C, los pocillos se lavaron con PBS-Tween (3 veces) y se incubaron durante 1 h (37 °C) en tampón 1 con el anticuerpo monoclonal específico del isotipo a detectar: anti-IgG1 K139 (Sinkora *et al.*, 2001) y anti-IgM 5C9 (ATCC) cedidos amablemente de Javier Dominguez (INIA); anti-IgG2, (Serotec, #MCA636) y anti- IgA (Serotec, #MCA638). Tras 4 lavados con PBS-Tween, las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (BioRad #172-1011) diluido en tampon 3 (2% leche en polvo descremada, 2% suero conejo en PBS-Tween) durante 45 min a 37 °C. Finalmente los pocillos se lavaron con PBS-Tween (4 veces) y se añadió el sustrato TMB T4444, revelándose la reacción como se describe en el apartado anterior.

4.20 Métodos estadísticos y análisis de datos

Los valores representados en las gráficas corresponden a la media de los datos \pm el valor de la desviación estándar de las muestras. Los datos fueron analizados con una t-student o análisis de la varianza (ANOVA), usando la distribución F de Fisher-Snedecor y aplicando la corrección de Bonferroni al test de la t de Student en el caso de las comparaciones múltiples. Para ello, se empleó el programa informático estadístico SPSS versión 19 (SPSS) o GraphPad Prism versión 6. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p determinado fue menor de 0.05, lo que se indica mediante un asterisco (*) en las gráficas. Cuando el valor de p determinado fue menor de 0.005 se indica con dos asteriscos (**).

4.21 Análisis estructurales de cápsidas víricas y modelado molecular

Para el análisis estructural de la cápsida de los virus estudiados se utilizaron las coordenadas atómicas depositadas en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) para el virus C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994), VFA O₁K (Fry *et al.*, 1999) y VREA (Tuthill *et al.*, 2009). Para localizar los residuos de aminoácidos en la estructura de las cápsidas se utilizó el programa PyMol (DeLano Scientific, Inc.).

4.22 Disoluciones y tampones

PBS: 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl

PBS-EDTA: 0.94 mM EDTA en PBS

PBS-Tween: 0.05% Tween20 en PBS

PBS-BSA: 1% BSA en PBS

Tripsina-EDTA: 0.5 mg/ml tripsina (Difco), 0.016% EDTA, 0.0015% rojo fenol, 1.12 mM glucosa disuelto en PBS

Tampón TNE: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl

5. RESULTADOS

5.1 Estudio del efecto combinado de mutaciones que confieren sensibilidades diferentes a pH ácido

5.1.1 La labilidad a pH ácido conferida por sustituciones en la región interpentamérica del VFA C-S8c1 puede ser compensada por una sustitución en el extremo N-terminal de VP1

Como se ha comentado en el apartado 2.2.6.1.2 de la Introducción de esta Tesis Doctoral, las sustituciones VP3 A116V y VP3 A118V incrementan la labilidad a pH ácido de la cápsida de VFA (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). Contrariamente, la sustitución VP1 N17D hace el virus más estable a pH ácido (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Mientras que los residuos VP3 A116 y A118 se sitúan cerca de la interfaz interpentamérica (Fig. 11A), el residuo VP1 N17 se localiza en un parte interna de la cápsida (Fig. 11A), a una distancia de 18 y 25 Å de los residuos VP3 A116 y A118, respectivamente (Fig. 11B).

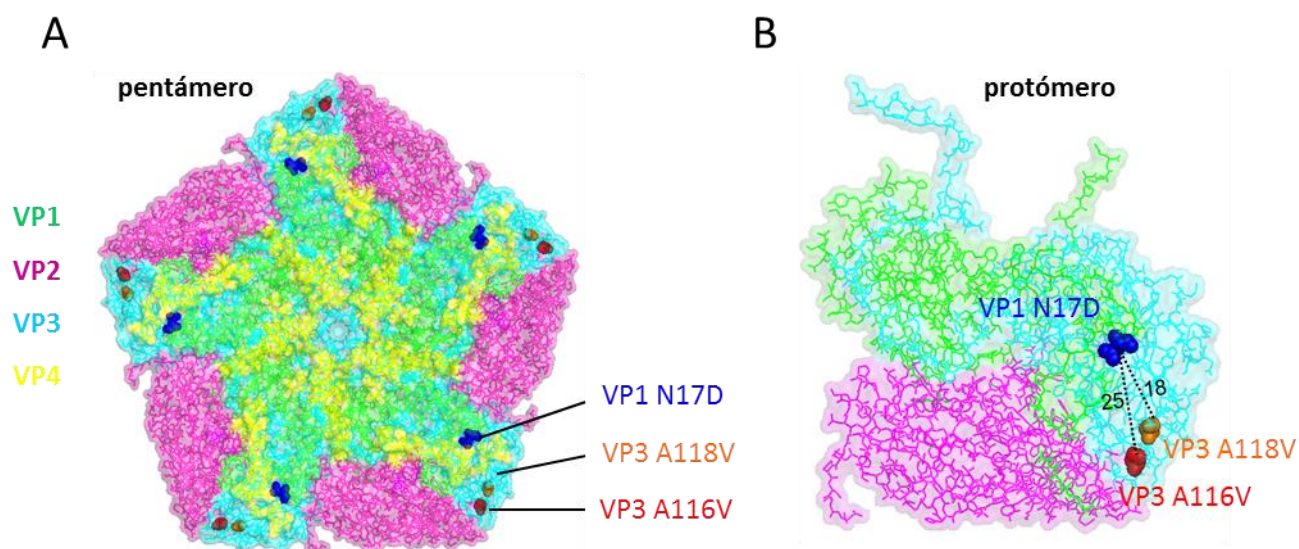


Figura 11. Localización de las mutaciones VP1 N17D, VP3 A116V y VP3 A118V en una subunidad pentamérica y en un protómero de la cápsida de VFA. A) Se representa la cara interna de un pentámero, construido a partir de la estructura con código PDB 1FMD y omitiendo las cadenas laterales de los aminoácidos para simplificar la figura. VP1 en verde, VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo. B) Distancia en Å entre los aminoácidos VP1 N17-VP3 A116 y VP1 N17-VP3 A118. Se representa la cara interna de un protómero biológico en la que VP4 se ha omitido para simplificar la figura.

Para determinar si la mutación N17D era capaz de estabilizar la cápsida de las variantes de VFA con las mutaciones VP3 A116V y VP3 A118V, este cambio se introdujo en el clon infeccioso pMT28 (que contiene el DNA correspondiente a la secuencia genómica completa del virus C-S8c1) en combinación con la mutación VP3 A116V o VP3 A118V, construyéndose por lo tanto dos plásmidos recombinantes pMT28 VP3 A116V VP1 N17D y VP3 A118V VP1 N17D. El RNA viral fue sintetizado a partir de cada uno de los clones infecciosos mediante transcripción *in vitro*, y utilizado para transfectar células BHK-21. Los virus recuperados de las transfecciones fueron amplificados mediante dos pases en esta línea

RESULTADOS

celular, tras lo que se determinó la secuencia consenso del RNA que codifica la región P1 de la poliproteína viral. Las mutaciones introducidas en los clones infecciosos se mantuvieron incluso después de 10 pases seriados, demostrando la estabilidad genética de estos virus. Puesto que ambos mutantes produjeron placas de lisis en células BHK-21, el tamaño de éstas placas se comparó con las del virus parental y de los mutantes simples VP3 A116V, VP3 A118V y VP1 N17D (Fig. 12A). El doble mutante VP3 A116V VP1 N17D dio lugar a placas de lisis comparables a las de C-S8c1 y de los mutantes simples VP3 A116V y VP1 N17D. En cambio, el doble mutante VP3 A118V VP1 N17D produjo placas de menor tamaño (Fig. 12A), similares a las del mutante simple VP3 A118V (Fig.12A), cuyas placas de lisis son más pequeñas que las del virus parental (Martín-Acebes *et al.*, 2010). Todos los virus mostraron curvas de crecimiento similares en células BHK-21, aunque el doble mutante VP3 A118V VP1 N17D y el mutante simple VP3 A118V produjeron títulos menores a todos los tiempos analizados (Fig. 12B). A continuación, se analizó, mediante ensayos de inactivación, la sensibilidad a pH ácido de los dobles mutantes VP3 A116V VP1 N17D y VP3 A118V VP1 N17D (apartado 4.14.2). Los valores de pH_{50} (el pH que provoca una pérdida de la infectividad del 50%) (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Martín-Acebes *et al.*, 2011b), fueron calculados y comparados con el del virus C-S8c1 (Fig. 12C). El virus con la mutación N17D en el N-terminal de VP1 fue el más resistente a pH ácido, mostrando un pH_{50} de 6.13. Este valor es consistente con el determinado previamente para este virus (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Por otro lado, los virus más lábiles a pH ácido fueron los que llevan las sustituciones VP3 A116V y VP3 A118V, que mostraron valores de pH_{50} de 6.87 y 6.93, respectivamente (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). Los dobles mutantes VP3 A116V VP1 N17D y VP3 A118V VP1 N17D (pH_{50} 6.67 y 6.56, respectivamente) mostraron un fenotipo intermedio entre el virus más resistente a pH ácido (N17D) y los más lábiles (VP3 A116V y VP3 A118V), con perfiles de inactivación similar al del virus C-S8c1 (pH_{50} 6.65). Estos resultados indican que la introducción de la sustitución VP1 N17D en las cápsidas altamente lábiles de los virus que llevan las sustituciones VP3 A116V y VP3 A118V aumenta la resistencia del virión a pH ácido hasta niveles similares al del virus parental C-S8c1.

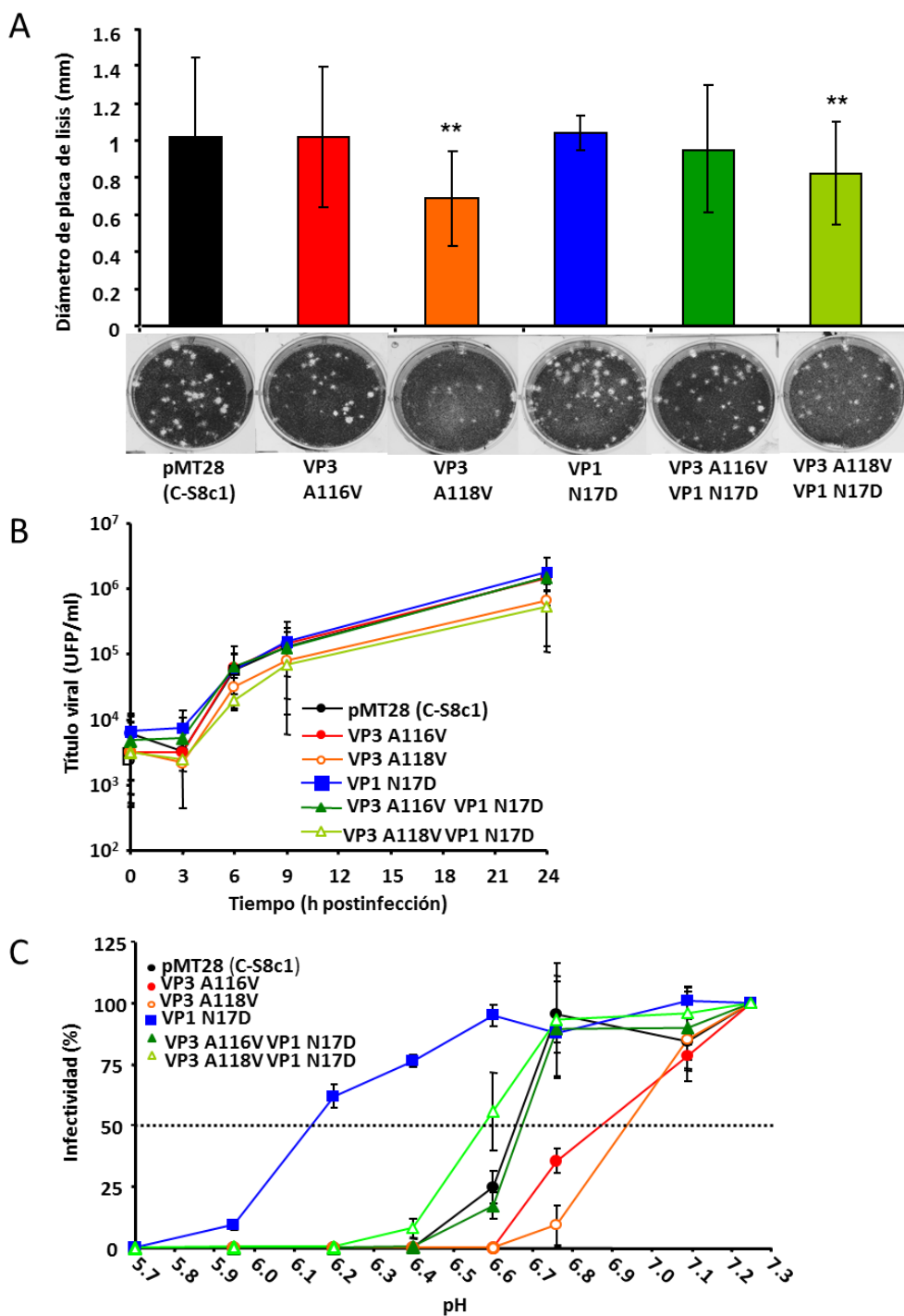


Figura 12. La sustitución VP1 N17D estabiliza las cápsidas altamente lábiles de los mutantes VP3 A116V y VP3 A118V, sin comprometer la infectividad del virus en cultivos celulares. A) Análisis del tamaño de placa de los virus recuperados del clon infeccioso pMT28 y de sus variantes que codifican las sustituciones de aminoácido indicadas. Se infectaron células BHK-21 en medio semisólido durante 24 h que posteriormente se fijaron y se tiñeron con cristal violeta. Se analizaron alrededor de 100 placas por cada virus, usando el programa ImageJ. Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas entre el virus parental (C-S8c1) y los mutantes. B) Curva de crecimiento de los virus indicados en el panel A. Se infectaron Células BHK-21 a una m.d.i. de 1 UFP/célula y el virus extracelular producido a diferentes tiempos post-infección se tituló mediante ensayo de formación de placas. C) Sensibilidad a pH ácido de los virus mostrados en el panel A. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.14.2. La infectividad se determinó como el porcentaje de las UFP recuperadas a cada pH con respecto a las obtenidas a pH neutro (7.3). La intersección entre las curvas y la línea discontinua indica el valor de pH_{50} .

RESULTADOS

5.1.2 Selección y caracterización de variantes de VFA con la cápsida más lábil mediante tratamiento con NH₄Cl

Con el objetivo de identificar las regiones implicadas en la desencapsidación de VFA, nos planteamos someter al virus a la presión selectiva inducida por una droga que aumenta el pH endosomal, forzando, de esta manera, al virus a aumentar su pH de desencapsidación. Para ello, el virus C-S8c1 y sus variantes VP1 N17D, que desencapsida a pH más ácido, y VP3 A116V VP1 N17D, doble mutante que desencapsida a pH similar al del virus parental, se recuperaron de los clones infecciosos y se sometieron a pase seriados en presencia de NH₄Cl (apartado 4.10.1). Los mutantes con las sustituciones VP3 A116V y VP3 A118V no se incluyeron en este experimento porque estos virus son ya resistentes a NH₄Cl (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012), y presentan cápsidas altamente lábiles a pH ácido (Fig. 12C). Por otro lado, el doble mutante VP3 A118V VP1 N17D no se empleó en este experimento, debido a su fenotipo de placa pequeña (Fig. 12A) y a su menor crecimiento en medio líquido (Fig. 12B), lo que hacía suponer una bajada en su eficacia biológica (*fitness*). Con cada uno de los virus seleccionados se llevaron a cabo 10 o 20 pases seriados en presencia de NH₄Cl. En cada uno de estos pases, el virus total recogido al observarse efecto citopático (normalmente a las 18 h post-infección) fue empleado para la siguiente infección. En el pase 10, se extrajo el RNA viral y se determinó la secuencia consenso de la región P1 de cada población viral (Tabla III). En aquellos casos en los que no se detectó ninguna mutación impuesta en la población viral, el virus correspondiente se sometió a otros 10 pases seriados adicionales (Tabla III, asterisco).

Tabla III. Mutaciones seleccionadas en la cápsida de las variantes de VFA de serotipo C, tras pases seriados en presencia de NH₄Cl

| Virus parental | Exp. ^b | Mutaciones seleccionadas en las proteínas de la cápsida viral ^a | | | |
|----------------|-------------------|--|---------------------|--|----------------------|
| | | VP4 | VP2 | VP3 | VP1 |
| pMT28 (C-S8c1) | 1 | | | C2895A D115E ^{*c} | |
| | 2 | | | | T3259C Y18H * |
| | 3 | | | | G3238A V11I |
| VP1 N17D | 1 | | | | A3241G T12A |
| | 2 | | G2473T G193C | | |
| | 3 | | | G2896T A116T C2903T A118V | |
| VP3 A116V | 1 | | | | C3272A T22N |
| VP1 N17D | 2 | | | | A3257G D17G * |
| | 3 | | | | C3242T T12I * |

^a En cada caso se indica la sustitución de nucleótido y las correspondientes de aminoácido (en negrita) encontradas tras pases seriados en presencia de 25 mM NH₄Cl, con respecto a la secuencia de la población del virus parental. La numeración corresponde a la del genoma de C-S8c1 (Toja *et al.*, 1999). Las sustituciones nucleotídicas se encontraron después 10 pases, o tras 20 pases adicionales. Un asterisco indica que la sustitución nucleotídica fue detectada tras 20 pases, no siendo dominante en el pase 10. ^b Los números indican series de pases independientes.

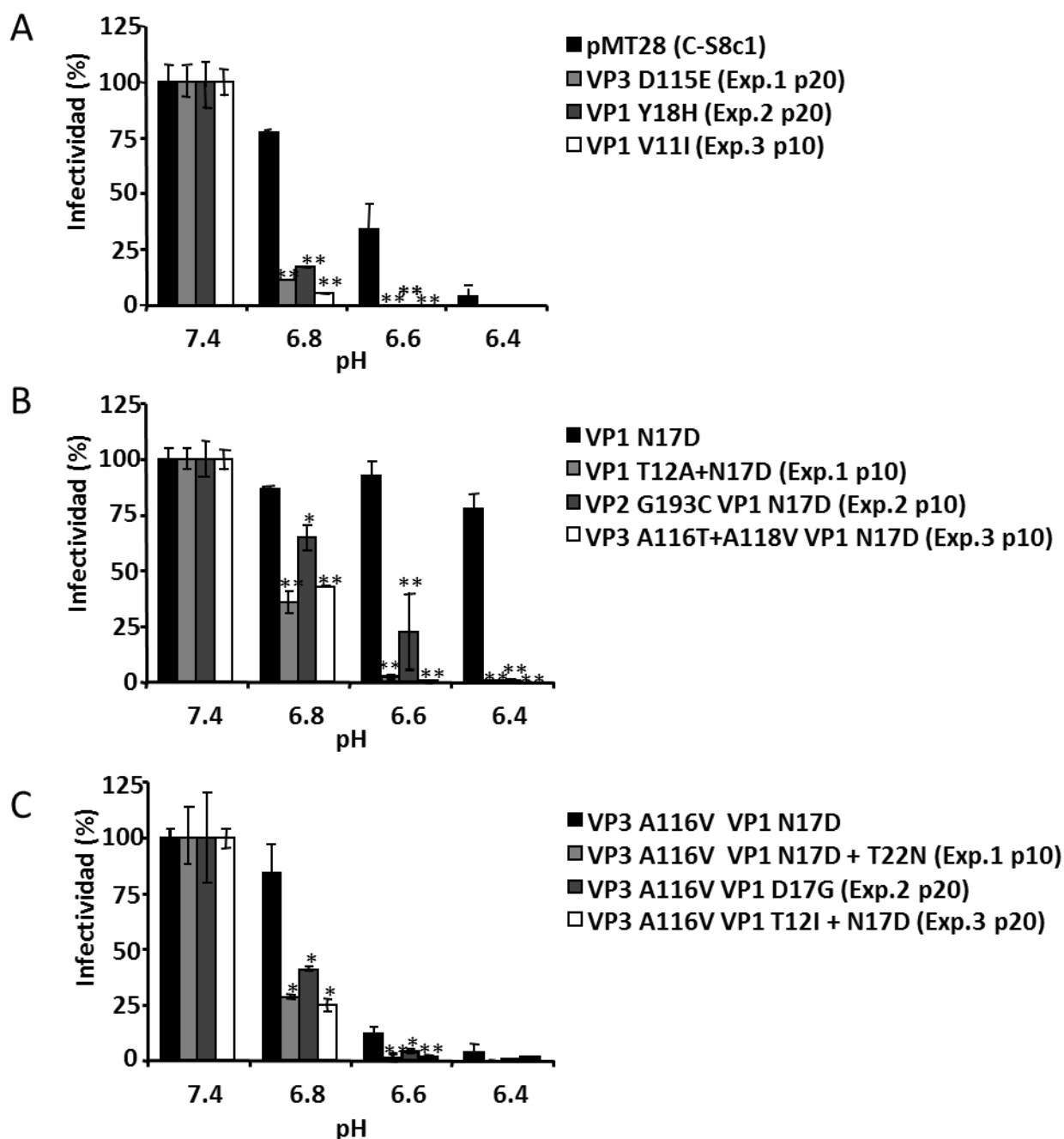


Figura 13. Las poblaciones virales seleccionadas tras pases seriados en presencia de NH₄Cl son lábiles a pH ácido. Se muestra el perfil de sensibilidad a pH ácido de los virus parentales (C-S8c1 recuperado de pMT28 en el panel A, VP1 N17D en el panel B y VP3 A116V VP1 N17D en el panel C) en comparación con los de los virus seleccionados tras sus respectivos pases seriados en presencia de NH₄Cl. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.14.2. La infectividad se calculó como el porcentaje de UFP recuperadas a cada pH con respecto a las obtenidas a pH neutro (7.4). “Exp.”(experimento) indica una serie individual de pases (Tabla III). En cada caso se indica también el pase analizado y las sustituciones aminoacídicas encontradas con respecto a la secuencia consenso de C-S8c1. Se representan con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas entre los virus parentales y los mutantes. Estos experimentos se llevaron a cabo en triplicado para cada virus.

RESULTADOS

Todos los virus analizados mantuvieron las mutaciones iniciales y adquirieron, tras los pases, sustituciones en otros residuos de la cápsida diferentes a los inicialmente mutados, excepto el mutante VP3 A116V VP1 N17D en el experimento 2, en el que se encontró una pseudoreversión en uno de sus residuos mutados (VP1 D17G). Los aminoácidos sustituidos se localizaron en VP3 o VP1, excepto en el caso de la sustitución VP2 G193C, seleccionada a partir del mutante VP1 N17D (experimento 2). Asimismo, se encontraron dos sustituciones en el mismo residuo de VP1 (T12A y T12I) en dos poblaciones diferentes (experimento 1 con el mutante VP1 N17D, y experimento 3 con el doble mutante VP3 A116V VP1 N17D). Cabe destacar que la población viral resultante del experimento 3 con el mutante VP1 N17D acumuló dos sustituciones adicionales en posiciones ya descritas como importantes para la estabilidad de la cápsida (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). Una de ellas, VP3 A118V, se había encontrado previamente en el virus lábil a pH ácido c2 (Martín-Acebes *et al.*, 2010), mientras que la otra, VP3 A116T, fue diferente a la encontrada en otro mutante lábil a pH ácido, el virus av1, que presentaba una sustitución del mismo residuo a otro aminoácido (A116V) (Vázquez-Calvo, 2012). Las mutaciones VP3 A116T y VP3 A118V se detectaron de forma simultánea en el pase 3, llegando a ser dominantes en el pase 4. Todas las poblaciones seleccionadas tras los pases en presencia de NH₄Cl mostraron una mayor sensibilidad a pH ácido (Fig. 13A-B-C), confirmando el incremento en el pH de desencapsidación debido a la presión selectiva generada por la presencia de la droga.

Con objeto de demostrar que las mutaciones encontradas en los virus pasados en presencia de NH₄Cl eran las responsables de la mayor labilidad de la cápsida, se empleó el plásmido pMT28 para introducir cuatro combinaciones de mutaciones encontradas en los virus pasados en presencia de NH₄Cl. De esta manera, se construyeron los clones infecciosos pMT28 VP1 V11I, pMT28 VP1 T12A+N17D, pMT28 VP3 A116T+A118V VP1 N17D y pMT28 VP3 A116V VP1 N17D+T22N y los virus correspondientes se recuperaron tras transfección del RNA viral producido *in vitro* y un pase adicional en células BHK-21. A continuación, se examinó la labilidad a pH ácido de estos virus comparándolos, en cada caso, con la del virus parental del que se habían originado (Fig. 14A-B-C). El virus con la mutación V11I (pH₅₀ 6.92) mostró una mayor sensibilidad a pH ácido comparado con el virus parental C-S8c1 (pH₅₀ 6.65) (Fig. 14A), confirmando que la mutación V11I era la responsable del incremento en la labilidad a pH ácido del virus. De la misma forma, la introducción de las sustituciones VP1 T12A o VP3 A116T+A118V en el contexto genético del mutante VP1 N17D provocó un aumento del pH₅₀ de 6.13 (VP1 N17D) a 6.9 y 6.93 para VP3 A116T+A118V VP1 N17D y VP1 T12A+N17D, respectivamente (Fig. 14B). Asimismo, la introducción de la mutación T22N en el contexto genético

del mutante VP3 A116V VP1 N17D provocó, también, un aumento en la sensibilidad a pH ácido, incrementando el pH_{50} desde 6.67 (VP3 A116V VP1 N17D) hasta 6.9 (VP3 A116V VP1 N17D + T22N) (Fig. 14C). Estos datos demuestran que las sustituciones de aminoácido seleccionadas tras los pases en presencia de NH_4Cl son las responsables de los fenotipos de labilidad a pH ácido de los virus.

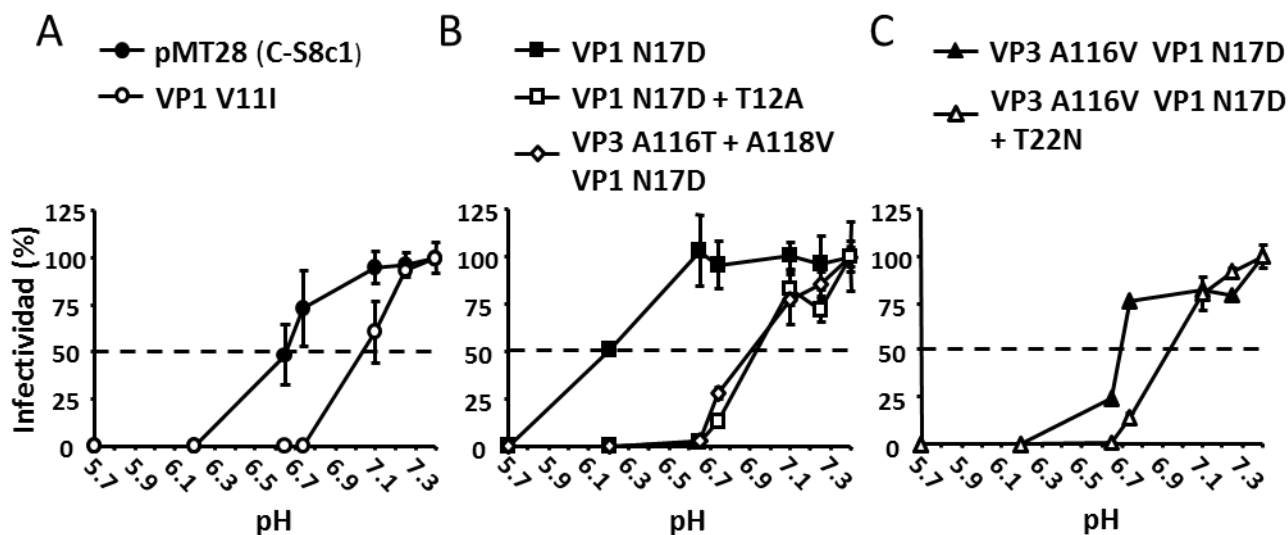


Figura 14. Perfiles de sensibilidad a pH ácido de los virus C-S8c1, VP1 N17D y VP3 A116V VP1 N17D, en comparación con sus derivados que presentan las sustituciones de aminoácido seleccionadas en presencia de NH_4Cl . Todos los virus empleados se recuperaron mediante transfección del RNA transcrito a partir del clon infeccioso pMT28 y sus derivados mutados. El ensayo de inactivación a pH ácido se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.14.2. La infectividad se calculó como el porcentaje de UFP recuperadas a diferente pH utilizado con respecto a las obtenidas a pH 7.4. La intersección entre la curva de inactivación y la línea discontinua indica el valor de pH_{50} .

5.1.3 Las mutaciones de adaptación a NH_4Cl se localizan en la interfaz interpentamérica o en el extremo N-terminal de VP1

Cuando las sustituciones de aminoácido seleccionadas por los virus pasados en presencia de NH_4Cl (Tabla III) se mapearon en la estructura de C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994) (Fig. 15), cuatro de ellas, una en VP2 (G193C) y tres en VP3 (D115E, A116T y A118V), se localizaron cerca de la interfaz interpentamérica, una región ya descrita como importante para la estabilidad de la cápsida (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Mateo *et al.*, 2003). Por otro lado, todas las sustituciones encontradas en VP1 (V11I, T12A, T12I, D17G, Y18H y T22N) se situaron en la parte interna de la cápsida, en el extremo N-terminal de esta proteína, destacando la implicación de esta región en la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VFA. Estos resultados sugieren que la interfaz interpentamérica y el extremo terminal de VP1 definen dos regiones que controlan la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VFA y que diferentes sustituciones de aminoácido en estas regiones pueden modular su fenotipo.

RESULTADOS

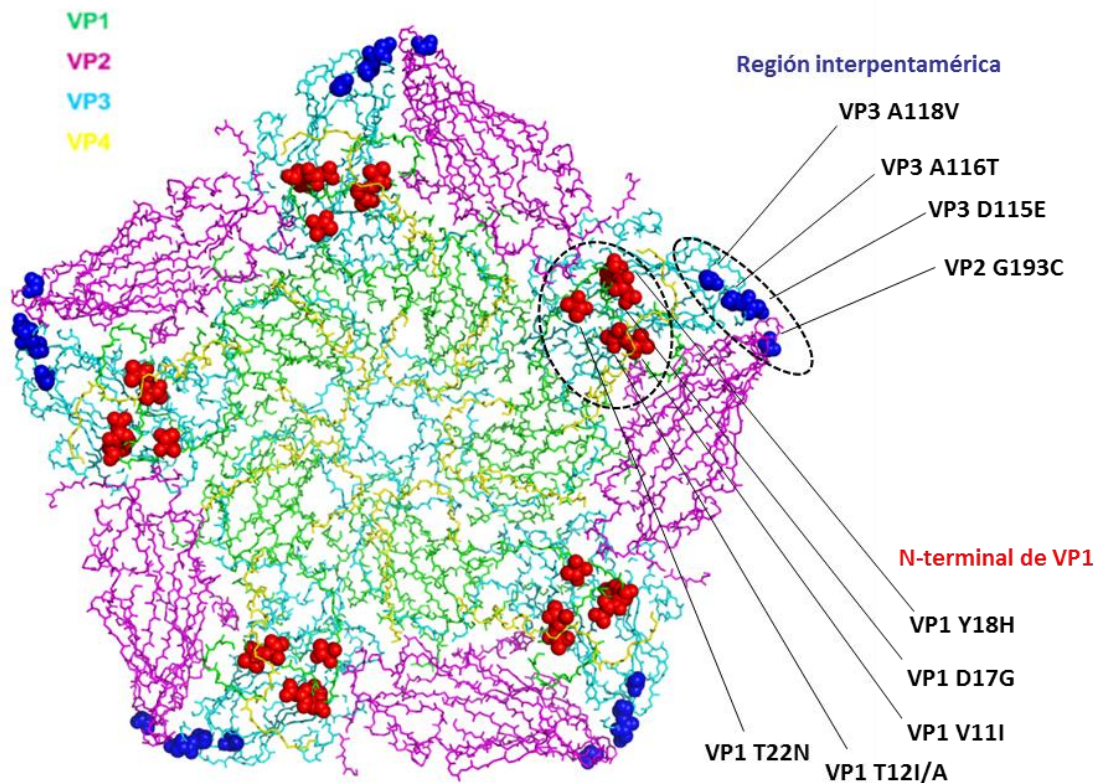


Figura 15. Localización de las mutaciones encontradas en las poblaciones virales crecidas en presencia de NH₄Cl. Se muestra la cara interna del pentámero, construido como en la Fig. 11. Las cadenas laterales de los aminoácidos han sido omitidas para simplificar la figura. Con esferas rojas se indican las mutaciones que se agrupan en el extremo N-terminal de VP1 y con esferas azules las que se agrupan próxima a la interfaz interpentamérica. VP1 en verde, VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo.

5.1.4 Mutaciones en VP3 y en el extremo N-terminal de VP1 modulan la resistencia a pH ácido de VFA de tipo O

Para analizar si los resultados obtenidos con el serotipo C eran extrapolables a otros serotipos de VFA, se aislaron y se caracterizaron mutantes de serotipo O con sensibilidad a pH ácido incrementada. Para ello, se plaquearon en células BHK-21 diluciones seriadas de un preparado de virus VFA O₁K en presencia y en una ausencia de 25 mM NH₄Cl. De manera similar a lo descrito para el serotipo C (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012), el número de UFP obtenido en las células tratadas con NH₄Cl fue dos órdenes de magnitud menor que el obtenido en las células control sin tratar. Se seleccionaron 20 placas de lisis bien aisladas que habían crecido en presencia de NH₄Cl y el virus presente en ellas se amplificó mediante dos pases seriados en células BHK-21, secuenciándose la región del RNA viral correspondiente a VP3 y los primeros 70 aminoácidos de VP1. Sólo cuatro de las poblaciones virales secuenciadas (fc4, fc9, fc11, fc13) presentaron mutaciones en residuos de estas regiones (Tabla IV). Mientras que los virus fc4 y fc13 presentaban dos cambios

diferentes en el extremo N-terminal de VP1 (T12N y T2A respectivamente), los restantes dos (fc9 y fc11) mostraron la misma sustitución nucleotídica (A2695G), que codifica el cambio VP3 T156A. Puesto que los virus fc9 y fc11 habían seleccionado la misma sustitución, únicamente fc9 fue incluido en los experimentos siguientes. La secuenciación completa de la región codificante para las cuatro proteínas de la cápsida confirmó que las únicas sustituciones presentes en la cápsida de los virus fc13, fc4 y fc19 eran las anteriormente indicadas.

Tabla IV. Sustituciones seleccionadas en la cápsida de mutantes de VFA de tipo O aislados en presencia de de NH₄Cl

| Virus | Mutaciones seleccionadas en las proteínas de la cápsida viral ^a | | | |
|-------|--|-----|---------------------|--------------------|
| | VP4 | VP2 | VP3 | VP1 |
| fc4 | | | | C2924A T12N |
| fc9 | | | A2695G T156A | |
| fc11 | | | A2695G T156A | |
| fc13 | | | | A2893G T2A |

^a Se muestra la posición en el genoma O₁K (numeración como en Saiz *et al.*, 2001) y las sustituciones encontradas en los clones virales individuales obtenidos tras realizar infecciones en presencia de 25 mM NH₄Cl. Las sustituciones de aminoácido se indican en negrita.

Como se muestra en la Fig. 16^a, todos los mutantes mostraron un incremento en la sensibilidad a pH ácido (pH₅₀ 6.76, 6.81, 6.97 para los virus con las mutaciones VP3 T156A, VP1 T12N y VP1 T2A, respectivamente), respecto al virus O₁K (pH₅₀ 6.53). Cuando estas sustituciones de aminoácido se mapearon en la estructura de VFA de tipo O, se observó que todas se localizaban muy próximas entre sí, incluso VP3 T156A, a pesar de encontrarse en otra proteína (Fig. 16B). Estos datos apoyan la hipótesis de que el extremo N-terminal de VP1 regula la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VFA de tipo O, de la misma manera que ocurre en el serotipo C.

RESULTADOS

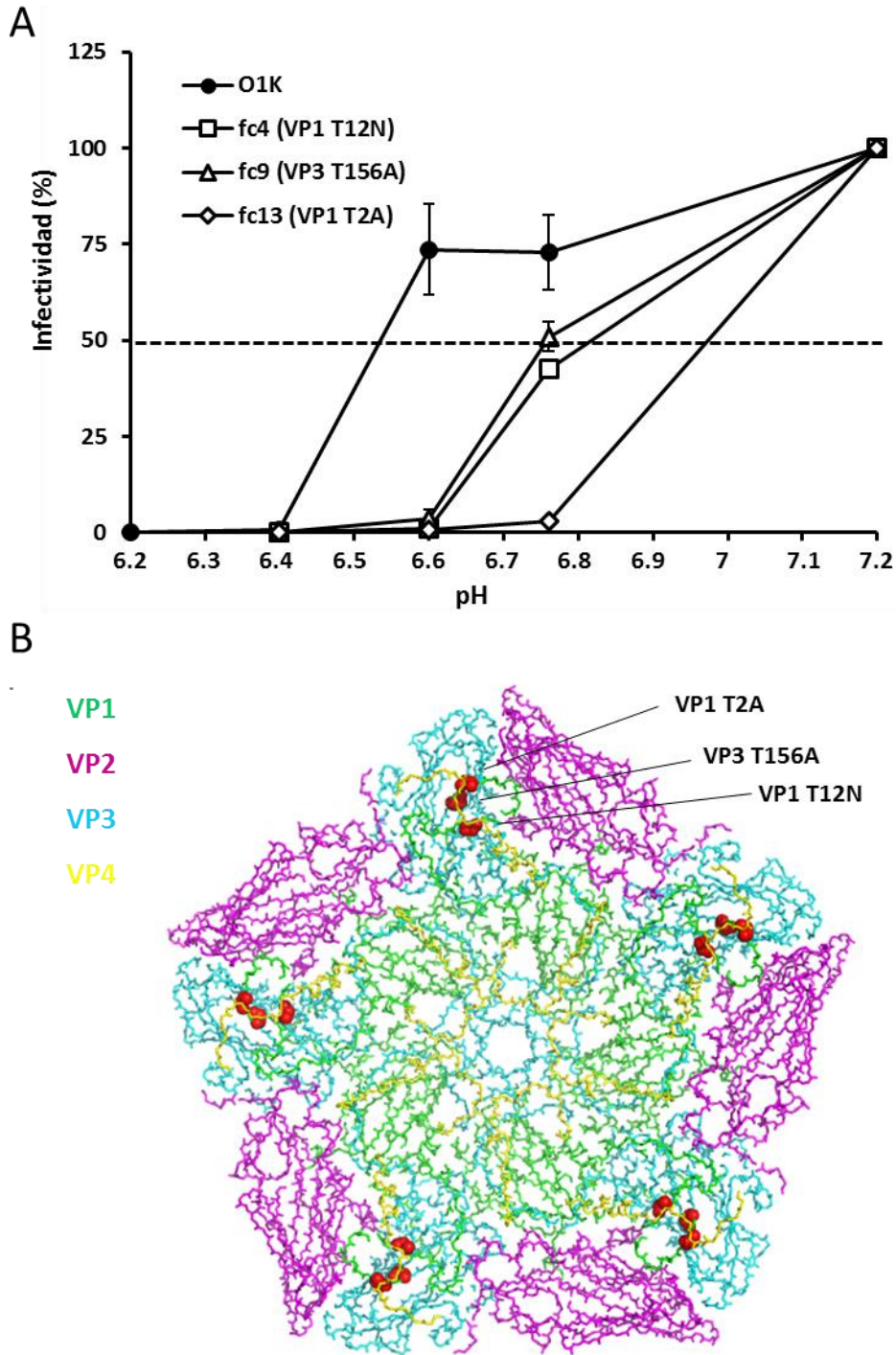


Fig. 16. Caracterización de los mutantes del serotipo O aislados en presencia de NH₄Cl. A) Sensibilidad a pH ácido de los mutantes de serotipo O aislados en presencia de 25 mM NH₄Cl. El ensayo de inactivación se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.14.2. La infectividad se calculó como el porcentaje de UFP recuperadas a cada pH con respecto a las obtenidas a pH neutro (7.2). La intersección entre la curva de inactivación y la línea discontinua indica el valor de pH50. B) Representación del pentámero de la cápsida de VFA de tipo O, construido a partir de la estructura con código PDB 1QQP. Se muestran las posiciones de las sustituciones encontradas en los virus aislados en presencia de 25 mM de NH₄Cl. Las cadenas laterales de los aminoácidos han sido omitidas para simplificar la figura. VP1 en verde, VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo.

5.2 Análisis de la resistencia a NH₄Cl del mutante VP3 A116V VP1 N17D

5.2.1 El mutante VP3 A116V VP1 N17D se comporta como un virus resistente a NH₄Cl

Existe una correlación entre el pH₅₀ de los virus y la resistencia a NH₄Cl, de manera que un pH₅₀ mayor (desencapsidación a un pH más alcalino) correlaciona con una menor inhibición por NH₄Cl (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). En cambio un pH₅₀ menor (desencapsidación a un pH más ácido) correlaciona con una mayor inhibición (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Esta relación se ha observado para la totalidad de los mutantes de VFA con sensibilidad diferencial a pH ácidos, caracterizados hasta la fecha (Biswal *et al.*, 2016; Martín-Acebes *et al.*, 2010; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Vázquez-Calvo, 2012; Wang *et al.*, 2014). En el apartado 5.1.1 se ha demostrado que, cuando se combinan en el mismo genoma una sustitución que confiere labilidad (VP3 A116V) y otra que confiere resistencia frente a pH ácido (VP1 N17D), se produce un efecto compensatorio, generando un virus cuya sensibilidad a pH ácido es similar a la del virus parental C-S8c1. Con objeto de analizar también la sensibilidad a NH₄Cl del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D, se infectaron monocapas de células BHK-21 pretratadas o no (control) con NH₄Cl con los virus C-S8c1, VP3 A116V, VP1 N17D y VP3 A116V VP1 N17D recuperados de los correspondientes clones infecciosos, determinándose a las 8 h p.i. el título viral producido.

Para facilitar las comparaciones entre los diferentes mutantes, el nivel de resistencia a NH₄Cl de cada uno de ellos se determinó como el ratio entre el título viral alcanzado en presencia de NH₄Cl y el alcanzado en su ausencia. De esta manera, un ratio de 1 indica que el compuesto no afecta el crecimiento del virus, ratios menores de 1 indican que lo inhibe y ratios mayores de 1 indican que el virus crece mejor en presencia del compuesto que en su ausencia.

Los resultados mostraron que en presencia de NH₄Cl, la producción del virus parental C-S81 (pH₅₀ 6.65, apartado 5.1.1) fue inhibida más de 10 veces (resistencia < 0.1, Fig.17). Sin embargo, el virus VP3 A116V (pH₅₀ 6.87, apartado 5.1.1) fue resistente a NH₄Cl, no siendo inhibido significativamente por esta droga (resistencia ~ 1, Fig. 17), de acuerdo a lo previamente descrito (Vázquez-Calvo, 2012). Por otro lado, el virus VP1 N17D (pH₅₀ 6.13, apartado 5.1.1) mostró una mayor inhibición frente a NH₄Cl que el parental C-S8c1 (resistencia ~ 0.01, Fig. 17). Sorprendentemente, el virus VP3 A116V VP1 N17D, a pesar de tener un pH₅₀ de 6.67 (apartado 5.1.1), casi idéntico a lo del virus parental, fue significativamente más resistente a NH₄Cl (resistencia > 0.1, Fig. 17). Puesto que las cápsidas del virus parental y del doble mutante mostraron una sensibilidad similar frente a pH ácido y esta propiedad se relaciona con la resistencia a NH₄Cl, se llevaron a cabo experimentos para determinar el mecanismo responsable de la resistencia a NH₄Cl del mutante VP3 A116V VP1 N17D.

RESULTADOS

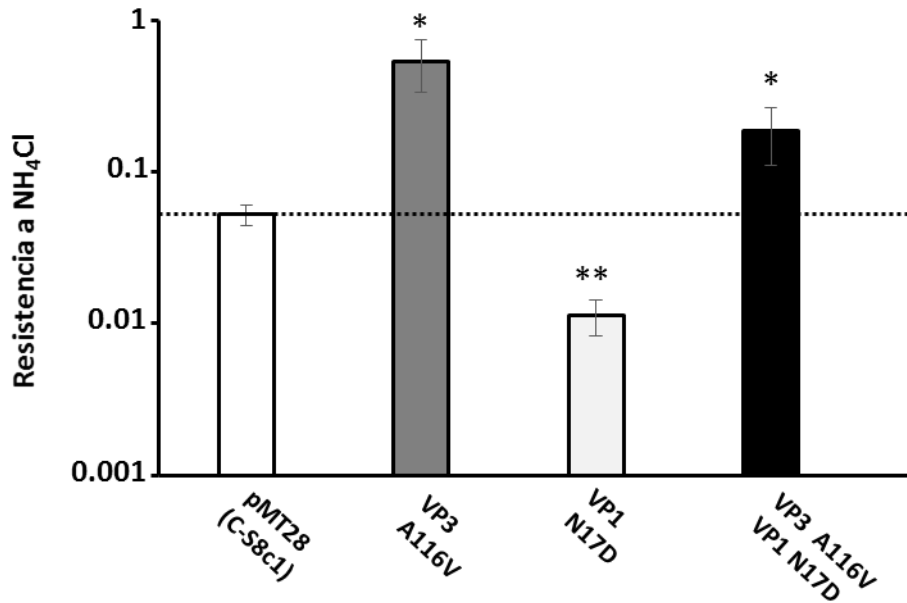


Figura 17. Resistencia a NH₄Cl del mutante VP3 A116V VP1 N17D. Se infectaron monocapas de células BHK-21, tratadas o no con NH₄Cl, con los virus C-S81 y sus variantes VP3 A116V, VP1 N17D y VP3 A116V VP1 N17D, recuperados de los clones infecciosos correspondientes. El título viral se determinó a las 8 h post-infección. La resistencia a NH₄Cl se define como el ratio entre el título alcanzado en presencia del compuesto y el alcanzado en su ausencia (control). La línea discontinua indica el nivel de resistencia a NH₄Cl del virus parental C-S8c1. Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de resistencia de los mutantes con respecto a C-S8c1.

5.2.2 La resistencia a NH₄Cl del mutante VP3 A116V VP1 N17D radica en cambios en la población viral en respuesta al tratamiento con NH₄Cl

Una posible explicación para la resistencia a NH₄Cl del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D es que en las poblaciones de este mutante sometidas a la presión selectiva que ejerce el NH₄Cl se hubiesen seleccionado mutantes resistentes a esta droga, que fuesen los responsables de este fenotipo. Para evaluar esta posibilidad, se comparó el perfil de inactivación a pH ácido de las poblaciones de este mutante resultante del experimento mostrado en la Fig. 17, crecidas en ausencia (control) o en presencia de NH₄Cl. Los resultados mostraron que el perfil de sensibilidad a pH ácido del mutante VP3 A116V VP1 N17D cambió significativamente tras el pase en presencia de NH₄Cl, respecto al pase control en ausencia de NH₄Cl (pH₅₀ ~6.5 y ~6.8, respectivamente) (Fig. 18). Sin embargo, no se observó este cambio en los perfiles de inactivación del virus C-S8c1 y de los mutantes simples VP3 A116V y VP1 N17D (pH₅₀ ~6.5, ~6.9 y <6.3, respectivamente). Con el objetivo de asociar el cambio en el perfil de inactivación a pH ácido del mutante VP3 A116V VP1 N17D con la posible selección de mutaciones en la secuencia consenso tras su crecimiento en presencia de NH₄Cl, se secuenció la región del genoma que codifica las proteínas de la cápsida de las poblaciones obtenidas tras el

tratamiento con el compuesto. En estos experimentos no se encontró ninguna sustitución nucleotídica impuesta en la secuencia consenso de cada una de las tres poblaciones independientes analizadas, sugiriendo que el fenotipo de resistencia a NH_4Cl no era el resultado de la selección de un único mutante en la población. La explicación de este fenómeno puede deberse a la selección de un conjunto heterogéneo de variantes virales, cada una en baja proporción en la cuasi-especie viral, ya que estos variantes minoritarios no podrían ser detectados en una secuencia consenso.

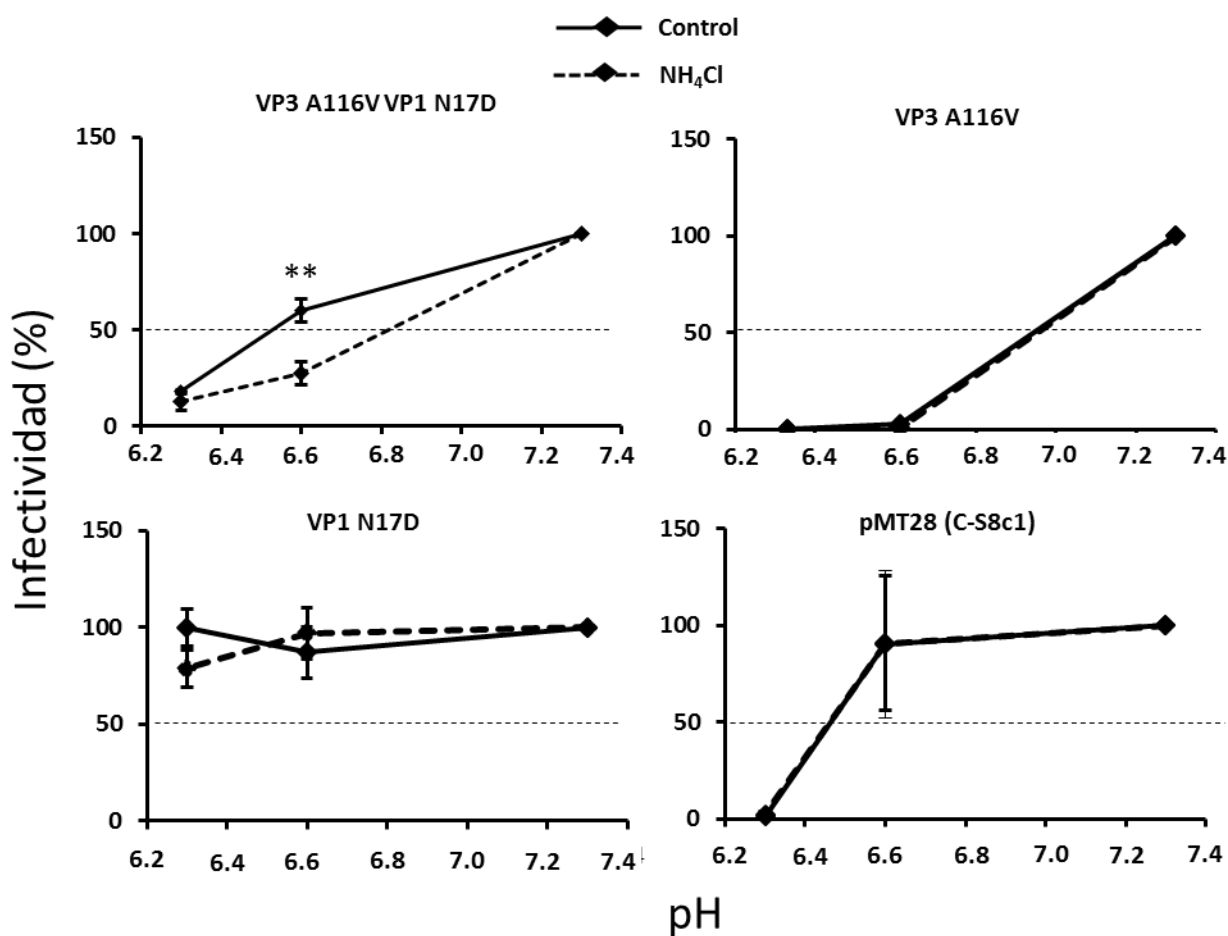


Figura 18. El mutante VP3 A116V VP1 N17D altera su perfil de inactivación tras el tratamiento con NH_4Cl . Los preparados virales obtenidos y analizados en la Fig. 17 amplificados en presencia (NH_4Cl) o ausencia (control) de 25 mM NH_4Cl se sometieron a ensayos de inactivación a diferentes pH como se describe en el apartado 4.14.2. La infectividad se determinó como el porcentaje del número de UFP recuperadas a cada pH con respecto a las obtenidas a pH 7.3. La intersección entre las curvas y la línea discontinua indica el valor de pH50. El doble asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre la población control y la pasada en presencia de NH_4Cl a pH 6.6.

RESULTADOS

5.2.3 Efecto de la multiplicidad de infección en la resistencia a NH_4Cl del virus C-S8c1 y del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D

Para investigar la hipótesis de una mayor frecuencia de variantes minoritarios resistentes a NH_4Cl en la población del mutante VP3 A116V VP1 N17D, nos planteamos estudiar el efecto de la multiplicidad de infección en la resistencia del doble mutante a esta droga, en comparación con el virus parental. De esta manera, si las variantes virales que llevan mutaciones de resistencia a NH_4Cl están poco representadas en la población total, cuanto más baja es la multiplicidad de infección, más alta debería ser la inhibición producida por este compuesto (Sheldon *et al.*, 2014). Los experimentos se llevaron a cabo con sobrenadante de transfección, es decir con virus recuperados directamente tras la transfección del RNA viral sintetizado *in vitro*, a partir de los plásmidos pMT28 y pMT28 VP3 A116V VP1 N17D (apartado 4.7 y 4.8), para minimizar el efecto de la amplificación del virus sobre la cuasiespecie. Para ambos virus, la inhibición causada por NH_4Cl fue mayor cuanto menor fue la m.d.i. empleada (Fig.19), sugiriendo que, en ambos casos, los niveles de inhibición producidos por el NH_4Cl dependen de la presencia de mutantes de resistencia dentro de la cuasiespecie viral. Sin embargo, el doble mutante fue más resistente a NH_4Cl que el virus parental a todas las m.d.i. analizadas, sugiriendo que los mutantes de resistencia podrían estar más representados en la población del doble mutante que en la del virus parental. De hecho, las diferencias entre los dos virus se acentuaron a medida que la m.d.i. empleada fue menor.

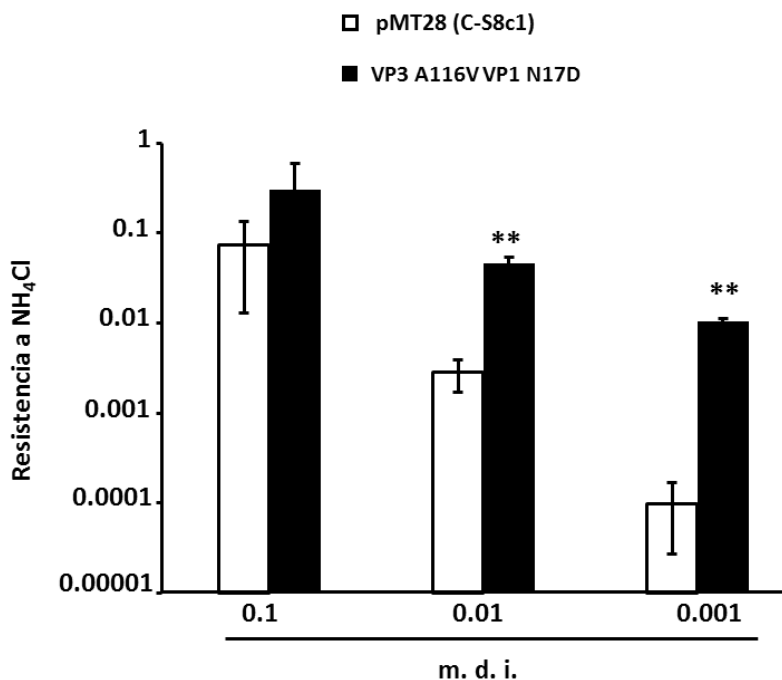


Figura 19. El mutante VP3 A116V VP1 N17D es más resistente a NH_4Cl que el virus parental. Se infectaron monocapas de células BHK-21 tratadas o no con NH_4Cl con las m.d.i. indicadas. El título viral se determinó a las 24 h p.i. La resistencia a NH_4Cl se define como el ratio entre el título viral alcanzado en presencia del compuesto y el alcanzado en su ausencia (control). Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas entre C-S8c1 y el mutante VP3 A116V VP1 N17D.

5.2.4 La frecuencia de selección de placas resistentes a NH₄Cl es más alta para el doble mutante VP3 A116V VP1 N17D que para el virus parental

Se ha descrito previamente que cuando el virus C-S8c1 se titula en presencia de NH₄Cl, se recupera alrededor del 0.1-10% de las placas de lisis que se producen en ausencia del compuesto (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). Asumiendo que la cantidad de placas de lisis capaces de crecer en presencia de NH₄Cl proporciona una estimación de la presencia o capacidad de selección de mutantes resistentes a NH₄Cl en las poblaciones virales, se decidió comparar el porcentaje de placas capaces de crecer en presencia de NH₄Cl entre el virus C-S8c1 y el doble mutante VP3 A116V VP1 N17D. Para ello, el RNA producido a partir de los clones infecciosos correspondientes se transfectó en células BHK-21 y los sobrenadantes se recogieron a las 48 h post-transfección, cuando se observó efecto citopático avanzado. Como en el experimento anterior, para minimizar la acumulación de mutaciones adicionales debida a los pases, se utilizaron sobrenadantes de transfección, sin someter el virus a ningún pase adicional. Así, se llevaron a cabo tres transfecciones independientes para cada virus. Los virus recuperados tras la transfección se plaquearon en presencia y en ausencia de NH₄Cl y se contó el número de placas de lisis producidas en cada condición. Para el virus C-S8c1, el porcentaje de placas que crecidas en presencia de NH₄Cl fue alrededor del 1% de las observadas en el control sin el compuesto. En cambio, para el mutante VP3 A116V VP1 N17D este porcentaje fue alrededor del 30%, valor significativamente mayor que el del virus parental (Fig. 20).

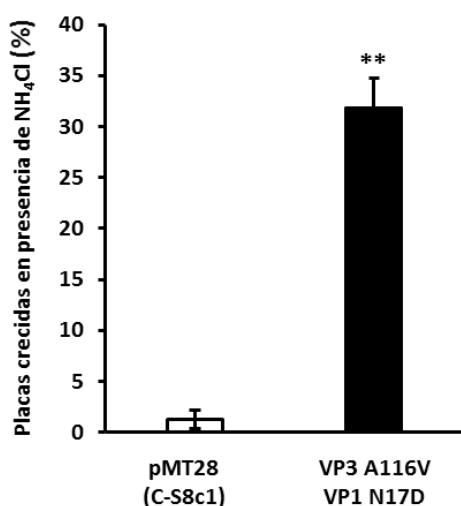


Figura 20. Porcentaje de placas de virus resistentes a NH₄Cl en los sobrenadantes de transfección de los plásmidos pMT28 y pMT28 VP3 A116V VP1 N17D. Los sobrenadantes de transfección se crecieron en medio semisólido en presencia y en ausencia de 25 mM NH₄Cl. Las placas de lisis se fijaron a las 30 h p.i. y se tiñeron con cristal violeta. El porcentaje de placas en presencia de la droga se determinó con respecto al número de placas en ausencia de la misma (control). El doble asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre virus parental C-S8c1 y el mutante VP3 A16V VP1 N17D.

A pesar de no poder distinguir con este abordaje si los virus formadores de placas obtenidos en presencia de la droga preexisten en la cuasiespecie o se seleccionan durante el crecimiento de la placa, este resultado es consistente con los datos anteriores, sugiriendo que el doble mutante posee

RESULTADOS

mayor potencial para escapar de la inhibición ejercida por el NH_4Cl en el medio de cultivo, probablemente debido a las variantes virales que componen su cuasiespecie.

5.2.5 Evaluación de la resistencia del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D frente a otros compuestos

A continuación, nos planteamos investigar si la resistencia, aunque parcial, del doble mutante a NH_4Cl se observaba también con otros inhibidores de VFA. Para ello elegimos el cloruro de guanidinio (GuHCl), un inhibidor de la RNA polimerasa de VFA que afecta a su replicación (Perales *et al.*, 2009), cuyo efecto comparamos con el del NH_4Cl . Para ello, se infectaron monocapas de células BHK-21, pretratadas o no con NH_4Cl o GuHCl, con los virus C-S8c1 y VP3 A116V VP1 N17D recuperados de los correspondientes clones infecciosos. A las 8 h post-infección se determinó el título viral producido.

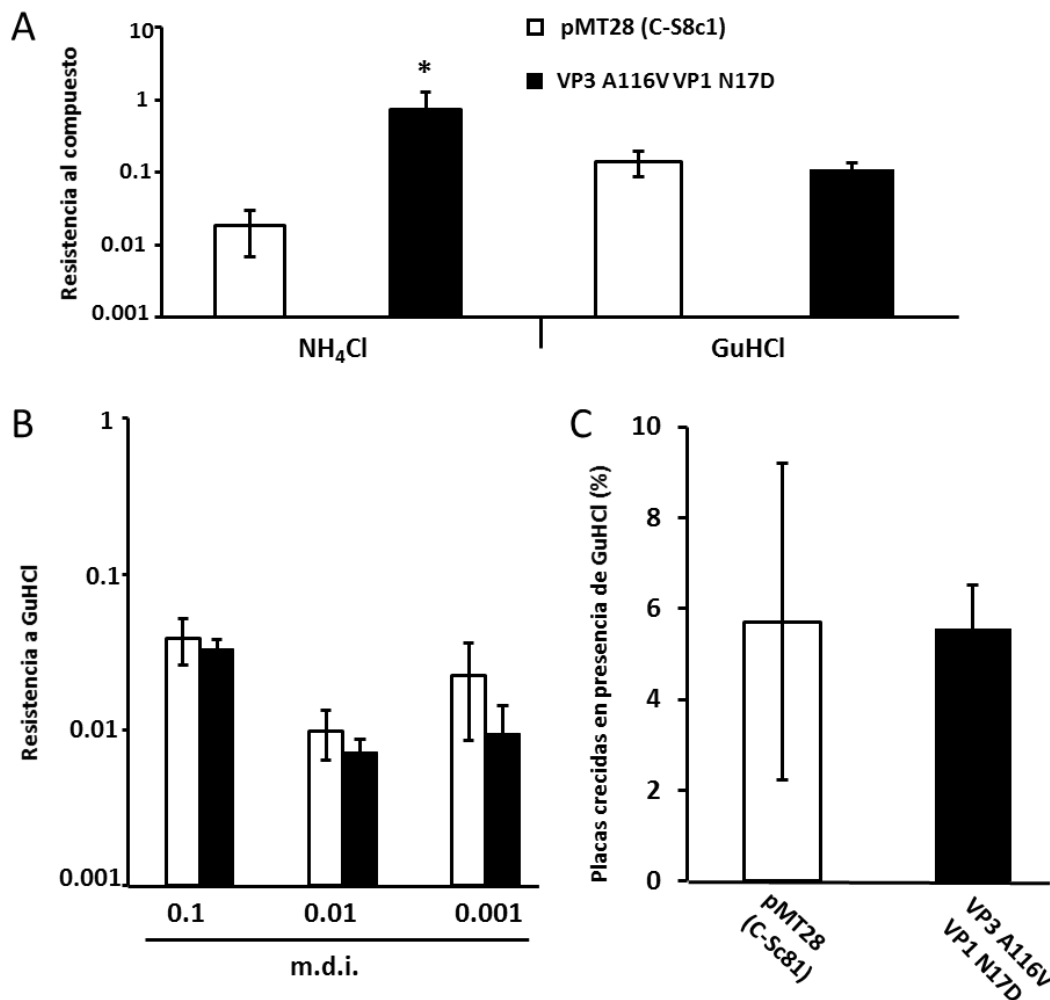


Figura 21. Evaluación de la resistencia del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D a GuHCl, otro inhibidor de VFA. A) Se infectaron monocapas de células BHK-21, pretratadas o no con 25 mM NH_4Cl o con 4mM de GuHCl, con los virus C-S8c1 o VP3 A116V VP1 N17D recuperados de los correspondientes clones infecciosos. El título viral se determinó a las 8 h p.i. La resistencia a GuHCl o NH_4Cl se define como el ratio entre el título alcanzado en presencia del compuesto y en su ausencia (control). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre los dos virus. B) Se infectaron

monocapas de células BHK-21, tratadas o no con 4 mM de GuHCl, a m.d.i. de 0.1, 0.01 y 0.001 UFP/célula. El título viral se determinó a las 24 h post-infección. La resistencia a NH₄Cl se determinó como en A. C) Los sobrenadantes resultantes de la transfección de los plásmidos pMT28 y VP3 A116V VP1 N17D se crecieron en medio semisolido en presencia y en ausencia de 4mM GuHCl. Las placas se fijaron a las 30 horas post-infección y se tiñeron con cristal violeta. El porcentaje de placas en presencia de la droga se determinó con respecto al número de placas en ausencia de la misma (control).

Como se muestra en la Fig. 21A, el virus VP3 A116V VP1 N17D fue resistente a NH₄Cl, de acuerdo a lo descrito previamente (apartado 5.2.1), y fue inhibido por GuHCl en la misma medida que el virus parental (Fig. 21A). A m.d.i. más bajas, las inhibiciones observadas por GuHCl con el virus parental y el mutante VP3 A116V VP1 N17D tampoco fueron significativamente diferentes (Fig. 21B), a diferencia de lo encontrado con NH₄Cl (apartado 5.2.3). Por último, el porcentaje de placas de lisis producidas en presencia de GuHCl, en un experimento similar a lo descrito en el apartado precedente para el NH₄Cl, fue también similar entre ambos virus (Fig. 21C). Estos resultados indican que la capacidad de adaptación del doble mutante a NH₄Cl es específica del mecanismo de acción de este compuesto y no se extiende a un inhibidor que afecta otros procesos en el ciclo viral.

5.2.6 El mutante VP3 A116V VP1 N17D presenta una capacidad replicativa (*fitness*) incrementada con respecto a C-S8c1 y se adapta a NH₄Cl adquiriendo mutaciones ventajosas

Con el objetivo de analizar el *fitness* del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D, los virus recuperados de los clones infecciosos pMT28 y pMT28 VP3 A116V VP1 N17D fueron empleados para realizar experimentos de competición en presencia o ausencia de NH₄Cl. Para ello, se infectaron células BHK-21 tratadas o no con NH₄Cl con una mezcla conteniendo la misma cantidad de UFP de los virus C-S8c1 y VP3 A116V VP1 N17D. La población viral resultante de esta infección se utilizó para infectar de nuevo células, tratadas o no con NH₄Cl, repitiéndose este proceso hasta 10 veces (apartado 4.12). A continuación, se estimó el porcentaje de los genomas que estaban compitiendo en los pases 2, 4, 6, 8 y 10 (Fig. 22A-B). En los tres experimentos independientes realizados se obtuvieron resultados similares. En ausencia del compuesto, la proporción del genoma del mutante VP3 A116V VP1 N17D fue ya dominante (~80%) a partir del pase 2 y aumentó progresivamente hasta desplazar totalmente el genoma del virus parental (Fig. 22A). La secuenciación del RNA correspondiente a la cápsida viral completa en el pase 10 mostró que el mutante había adquirido una mutación adicional en uno de los tres experimentos (experimento 2). Se trata de una sustitución nucleotídica (C3656A) que codifica el cambio VP1 T150K; esta sustitución ha sido descrita previamente en cultivos celulares, asociada a variación antigénica de C-S8c1 (Borrego *et al.*, 1993; Diez *et al.*, 1989). Puesto que no se encontraron trazas de este cambio en los pases anteriores (2, 4, 6, 8) y solo se encontró en uno de los

RESULTADOS

experimentos, asumimos que este cambio, per se, no era el responsable del incremento en *fitness* del virus VP3 A116V VP1 N17D.

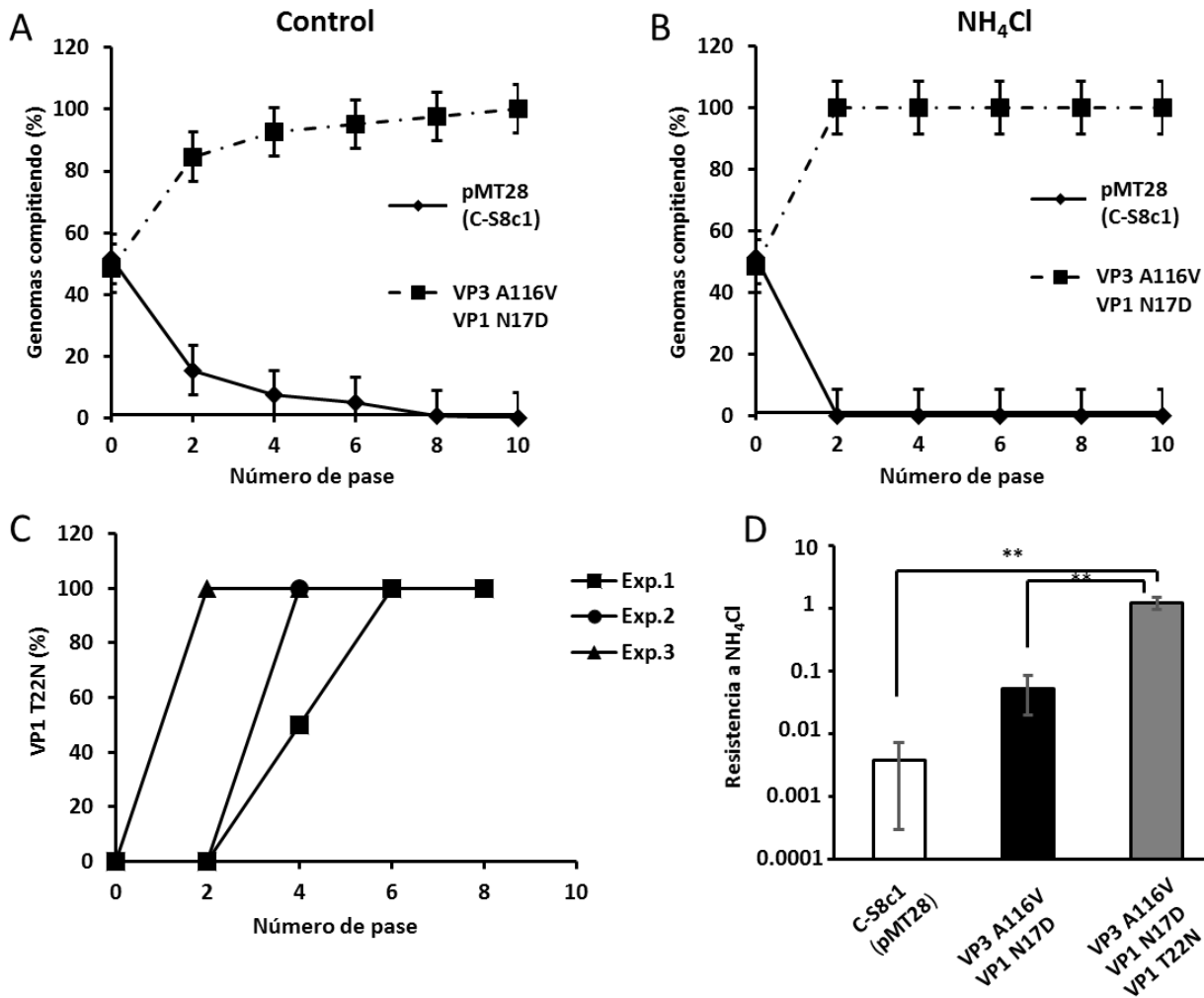


Figura 22. Las mutaciones VP3 A116V y VP1 N17D confieren una ventaja replicativa tanto en presencia como en ausencia de NH₄Cl. Se infectaron células BHK-21 con una mezcla de los virus recuperados de los clones infecciosos pMT28 (C-S8c1) o pMT28 VP3 A116V VP1 N17D [m.d.i. inicial de 0.1 UFP/célula (0.05 UFP/célula de cada virus)] en ausencia (A) y en presencia de 25 mM NH₄Cl (B). Cuando se observó efecto citopático completo se recogió el sobrenadante que fue utilizado para infectar nuevas monocapas de células. Estas infecciones seriadas se repitieron 10 veces. Se extrajo RNA de diferentes pases [0 (mezcla inicial), 2, 4, 6, 8 y 10] y el cDNA que codifica VP3 y VP1 fue sintetizado y secuenciado. La proporción de los genomas que competían fue estimada como se describe en el apartado 4.11. C) Imposición de la sustitución nucleotídica C3272A codificante para el cambio VP1 T22N, en el genoma del virus VP3 A116V VP1 N17D en los tres pases seriados independientes (Exp.1, Exp.2, Exp.3) llevados a cabo. El porcentaje de la posición mutada con respecto a la parental fue estimada como en A y en B. D) Comparación de la resistencia a NH₄Cl de los diferentes virus. Se infectaron monocapas de células BHK-21 tratadas o no con NH₄Cl se infectaron (m.d.i. 0.001 UFP/célula) con los virus C-S8c1, VP3 A116V VP1 N17D y VP3 A116V VP1 N17D+T22N recuperados de los clones infecciosos correspondientes. El título viral (virus total) se determinó a las 24 h p.i. La resistencia a NH₄Cl se define como el ratio entre el título viral alcanzado en presencia del compuesto y el alcanzado en su ausencia (control). Los dobles asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre triple mutante VP3 A116V VP1 N17D+T22N y los virus parentales C-S8c1 y VP3 A116V VP1 N17D.

En presencia de NH_4Cl , el mutante VP3 A116V VP1 N17D se impuso frente al virus parental de forma aún más rápida, alcanzando niveles cercanos al 100% ya en el pase 2 y que se mantuvieron hasta el final de los pases (Fig. 22B). En este caso, en los tres experimentos independientes, aunque en pases diferentes, el doble mutante adquirió una nueva mutación en su genoma (C3272A), que codifica para la sustitución VP1 T22N (Fig. 22C). Como se describe en el apartado 5.1.2 (Fig. 13C), este reemplazamiento, en el contexto genómico del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D, hace la cápsida de VFA más lábil frente a pH ácido.

Para asegurar que la mutación VP1 T22N confería también resistencia a NH_4Cl , los virus C-S8c1, VP3 A116V VP1 N17D y VP3 A116V VP1 N17D T22N recuperados de los respectivos clones infecciosos pMT28 se emplearon para infectar monocapas de células tratadas o no con NH_4Cl . Los resultados mostraron que la mutación VP1 T22N confiere resistencia total al NH_4Cl (resistencia = 1) en el contexto genómico del doble mutante (Fig. 22D).

En conjunto, estos resultados muestran que las mutaciones VP3 A116V VP1 N17D confieren al virus C-S8c1 un *fitness* mayor del virus parental C-S8c1, tanto en presencia como en ausencia de NH_4Cl . Además el doble mutante VP3 A116V VP1 N17D fija más rápidamente mutaciones de adaptación a esta droga que le permiten un mejor crecimiento en su presencia.

RESULTADOS

5.3 Aislamiento y caracterización de un mutante de VFA resistente a pH ácido: el mutante sr1

5.3.1 Aislamiento del mutante sr1

Se ha documentado previamente que la sustitución VP1 N17D, seleccionada en el mutante m6 tras tratamiento del virus C-S8c1 con pH 6, confiere sensibilidad incrementada a pH ácido a VFA de tipo C (Martín-Acebes *et al.*, 2011b), habiéndose descrito resultados similares en virus de serotipo O (Liang *et al.*, 2014) y Asia-1 (Wang *et al.*, 2014). Con objeto de profundizar en el conocimiento de las bases moleculares que determinan la resistencia a pH ácido de VFA, en esta Tesis Doctoral, partiendo del mutante m6, se ha aislado y caracterizado un nuevo mutante de VFA de tipo C que muestra una resistencia a pH ácido aún mayor. Para ello, se incubaron 10^6 UFP del mutante m6 en tampón PBS con pH 5.2 durante 30 min. A continuación el pH se neutralizó con tampón Tris 1 M pH 7.6. La muestra se usó para infectar células BHK-21 en medio semisólido (apartado 4.9.1), observándose una reducción del título viral alrededor de 6 órdenes de magnitud tras el tratamiento. Los virus contenidos en tres placas de lisis diferentes fueron recuperados y se amplificaron dos veces en las mismas células, previo tratamiento con pH 5.2 para mantener la presión selectiva (apartado 4.9.1.1). Sólo uno de los virus amplificados a partir de estas placas de lisis mostró un fenotipo de resistencia a pH ácido incrementada respecto a la del virus parental m6. A esta población se la denominó sr1 (de súper-resistente 1).

En la Fig. 23A, se muestran los perfiles de sensibilidad a pH ácido de los virus sr1, m6 y C-S8c1. El virus sr1 fue el que mostró una mayor resistencia a pH ácido. Los valores de pH_{50} determinados fueron de 5.4, 6.1 y 6.75, para sr1, m6 y C-S8c1, respectivamente, lo que muestra que la resistencia a pH ácido del mutante sr1 es en torno a 1.35 unidades de pH mayor que la de C-S8c1. A continuación, nos planteamos averiguar si el incremento en resistencia a pH ácido de la población sr1 podía comprometer de forma significativa su infectividad. Para ello, se analizó el tamaño de placa del virus sr1 que se comparó con los de m6 y C-S8c1. En este experimento se observó que sr1 desarrollaba placas de lisis ligeramente más pequeñas, con reducciones cercanas al 30% y al 20% de su diámetro, cuando se comparó con C-S8c1 y m6, respectivamente (Fig. 23B). Por otro lado, la cinética de crecimiento de los tres virus fue similar, aunque los títulos virales determinados para el mutante sr1 fueron inferiores a los de los virus C-S8c1 y m6 (Fig. 23C). Estos resultados indican que la población sr1, aislada a partir del mutante m6, presenta una resistencia incrementada a pH ácido, sin que se vea marcadamente afectada su infectividad en cultivos celulares.

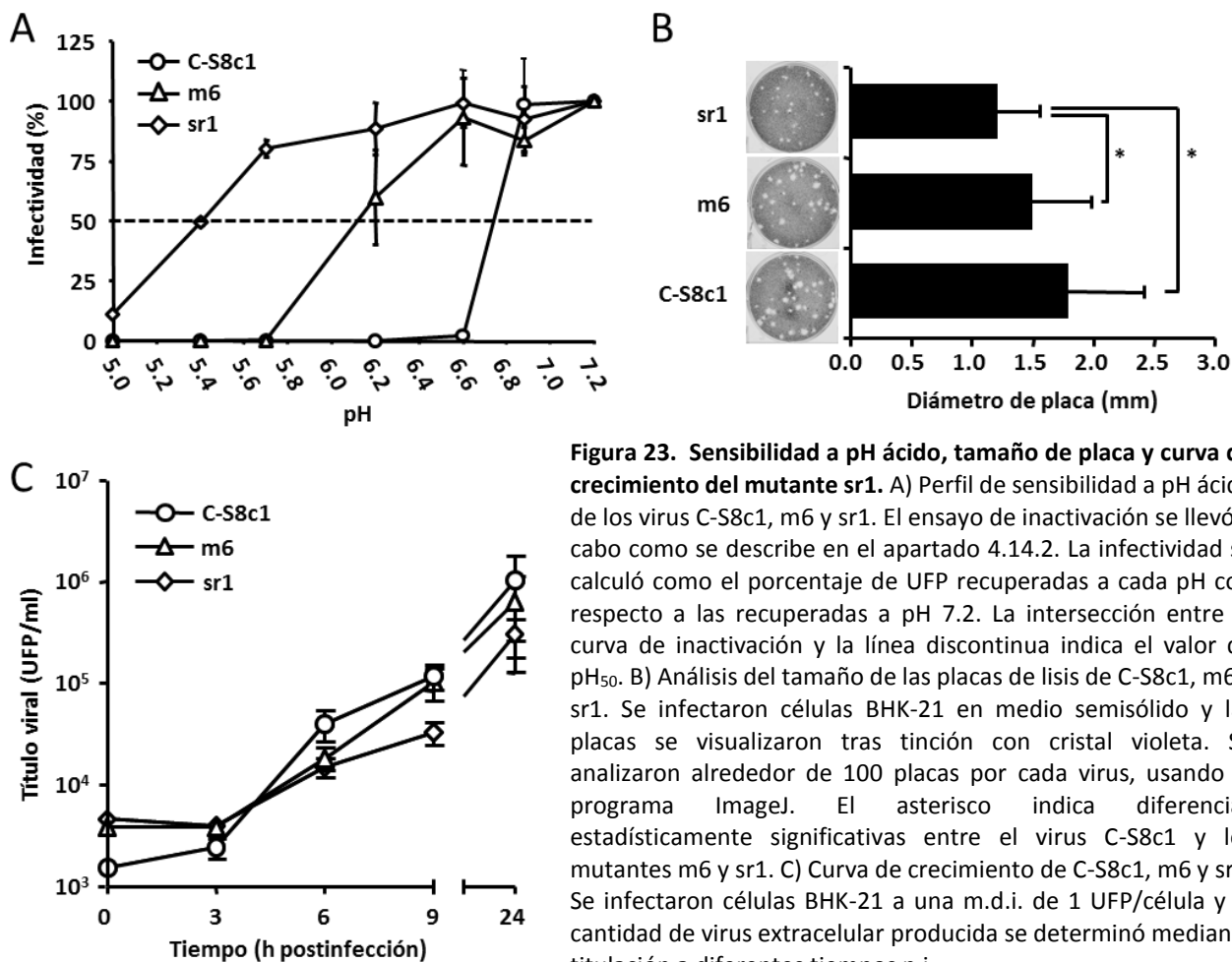


Figura 23. Sensibilidad a pH ácido, tamaño de placa y curva de crecimiento del mutante sr1. A) Perfil de sensibilidad a pH ácido de los virus C-S8c1, m6 y sr1. El ensayo de inactivación se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.14.2. La infectividad se calculó como el porcentaje de UFP recuperadas a cada pH con respecto a las recuperadas a pH 7.2. La intersección entre la curva de inactivación y la línea discontinua indica el valor de pH₅₀. B) Análisis del tamaño de las placas de lisis de C-S8c1, m6 y sr1. Se infectaron células BHK-21 en medio semisólido y las placas se visualizaron tras tinción con cristal violeta. Se analizaron alrededor de 100 placas por cada virus, usando el programa ImageJ. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre el virus C-S8c1 y los mutantes m6 y sr1. C) Curva de crecimiento de C-S8c1, m6 y sr1. Se infectaron células BHK-21 a una m.d.i. de 1 UFP/célula y la cantidad de virus extracelular producida se determinó mediante titulación a diferentes tiempos p.i..

5.3.2 El mutante sr1 es más sensible a drogas que aumentan el pH endosomal que los virus C-S8c1 y m6

Como se ha comentado anteriormente, el incremento en la resistencia a pH ácido de las partículas de VFA se ha asociado con una mayor inhibición del virus por compuestos que aumentan el pH endosomal, como NH₄Cl y Con A (apartado 5.2.1). Teniendo esto en cuenta, se analizó la sensibilidad del virus sr1 a estos compuestos. Aunque tanto el NH₄Cl como Con A inhiben la acidificación endosomal bloqueando la desencapsidación dependiente de pH ácido de los virus, su mecanismo de acción es diferente. El NH₄Cl actúa como una base débil en solución que secuestra los iones H⁺ bombeados en el interior del endosoma por la V-ATPasa (Dean *et al.*, 1984; Ohkuma y Poole, 1978). Sin embargo, Con A es un inhibidor específico de la V-ATPasa (Drose y Altendorf, 1997; Huss *et al.*, 2002). Los resultados mostraron que el mutante sr1 es más sensible a NH₄Cl y a Con A que los virus m6 y C-S8c1 (Fig. 24), confirmando que el aumento de la estabilidad a pH ácido del virión se correlaciona con un incremento en la sensibilidad a inhibidores de la acidificación endosomal.

RESULTADOS

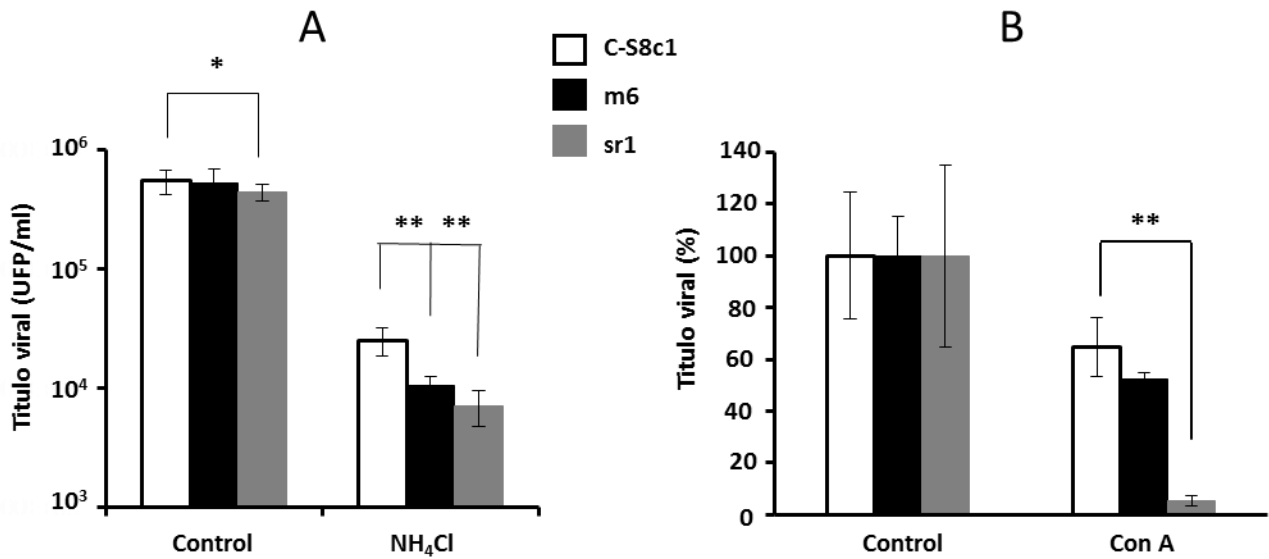


Figura 24. Sensibilidad del mutante sr1 a drogas que inhiben la acidificación endosomal. Se utilizaron monocapas de células BHK-21 pretratadas o no (control) con 25 mM de NH₄Cl durante 1 h (A) o con 100 nM Con A (B) durante 30 min. que fueron infectadas (m.d.i. de 0.5 UFP/célula) con los virus C-S8c1, m6 y sr1, manteniendo los fármacos durante toda la infección. El título viral producido se determinó 8 h p.i. Las diferencias estadísticamente significativas entre el virus C-S8c1 y los mutantes en las diferentes condiciones (control y NH₄Cl) se representan con asteriscos.

5.3.3 Análisis de las mutaciones en la cápsida seleccionadas en el mutante sr1

La secuenciación del RNA correspondiente a la región P1 de la poliproteína viral mostró que el mutante sr1 mantenía la sustitución nucleotídica A3256G, que codifica el cambio de aminoácido VP1 N17D (presente en el mutante m6) y que, además, había adquirido la sustitución C2329T, que codifica el cambio de aminoácido VP2 H145Y. La distancia entre el residuo VP1 N17D y el residuo VP2 H145Y es de 23.7 Å (Fig. 25A), lo que sugiere que entre los dos residuos no se establecen interacciones directas. Además el residuo VP2 H145 se localiza en la parte interna de la cápsida (así como VP1 N17D), en la interfaz intraprotomérica. En esta misma región se sitúa el residuo VP2 F34 (Fig. 25B), cuyo cambio (F34L) se ha descrito previamente en combinación con VP1 N17D en otro mutante (m1) que presentaba una resistencia a pH ácido ligeramente mayor al mutante simple VP1 N17D (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). De esta manera, estos resultados confirman la importancia de la interfaz intraprotomérica en la resistencia a pH ácido de la cápsida de VFA.

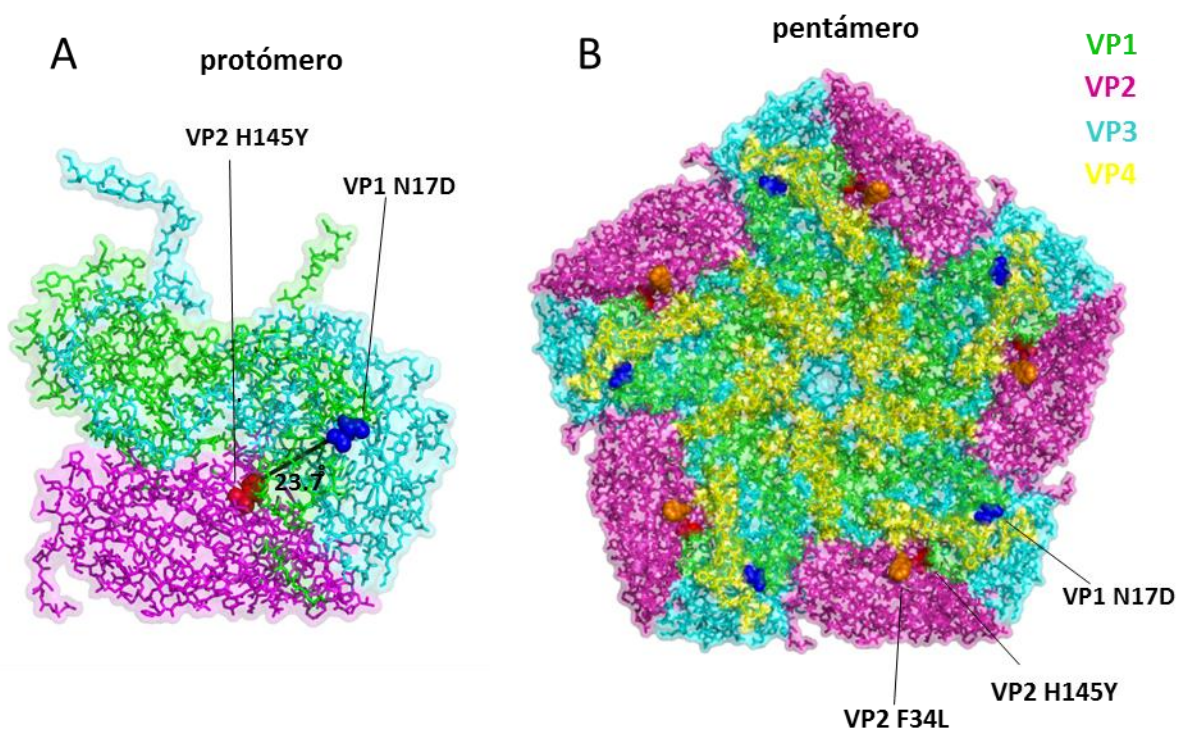


Figura 25. Localización en la estructura de la cápsida de C-8c1 de los residuos sustituidos en mutantes resistentes a pH ácido. A) Distancia en Å entre los aminoácidos VP1 N17D-VP2 H145Y. Se representa la cara interna de un protómero biológico en el que VP4 se ha omitido para simplificar la figura. B) Se representa la cara interna de un pentámero, construido como en la Fig. 11. VP1 en verde, VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo.

5.3.4 Las sustituciones VP1 N17D y VP2 H145Y son responsables del incremento en la resistencia a pH ácido de la cápsida del virus sr1

Para evaluar el papel del cambio VP2 H145Y encontrado en la cápsida del virus sr1, este reemplazamiento fue introducido en el clon infeccioso pMT28, solo o en combinación con la mutación VP1 N17D (apartado 4.6). El RNA viral fue sintetizado a partir de los dos clones infecciosos y se utilizó para transfectar células BHK-21. Los virus recuperados de estas transfecciones fueron amplificados mediante seis pases seriados en esta línea celular y se determinó la secuencia consenso del RNA que codifica la región P1 de la poliproteína viral. Las mutaciones introducidas se mantuvieron en ambos virus (VP2 H145Y y VP2 H145Y VP1 N17D), sin detectarse ningún cambio adicional hasta el pase 6, confirmando así la estabilidad genética de los virus. Para el resto de experimentos se utilizaron poblaciones del pase 2. Cuando estos virus se utilizaron para infectar células BHK-21 en medio semisólido, se observó que los mutante VP2 H145Y y VP2 H145Y VP1 N17D producían placas de lisis ligeramente más pequeñas que el mutante VP1 N17D y el virus parental C-8c1 (Fig. 26A), reproduciendo los resultados obtenidos para el virus sr1 (Fig. 23B).

Con el objetivo de diseccionar el papel de cada mutación en el fenotipo de resistencia a pH ácido del virus sr1 se analizó la sensibilidad a pH ácido de los mutantes simples (VP2 H145Y y VP1 N17D), del

RESULTADOS

doble mutante (VP2 H145Y VP1 N17D) y del virus C-S8c1. En este experimento se observó que la resistencia a pH ácido de C-S8c1 (pH_{50} 6.75) se incrementa en presencia del reemplazamiento VP2 H145Y, pero en menor medida que el incremento observado con la sustitución VP1 N17D: pH_{50} 6.3 para VP2 H145Y y 6.05, muy similar al del virus m6, para VP1 N17D (Fig. 26B). Estos aumentos en la resistencia a pH ácido fueron, en ambos casos, menores que el observado para el doble mutante VP2 H145Y VP1 N17D (pH_{50} 5.35, similar al virus sr1) (Fig. 26B), sugiriendo un efecto aditivo de las sustituciones VP2 H145Y y VP1 N17D en la estabilidad de la cápsida de VFA.

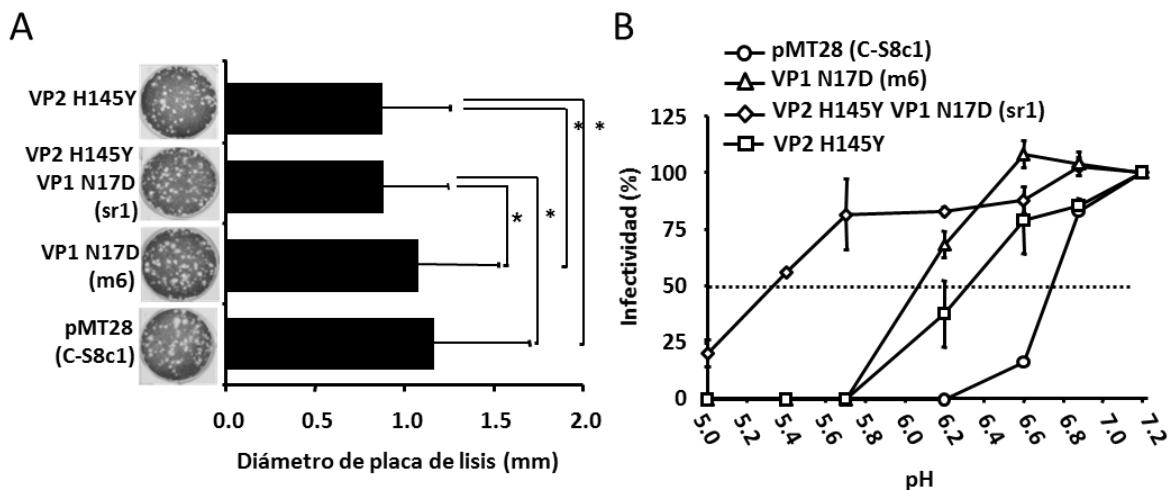


Figura 26. Efecto de las sustituciones VP2 H145Y y VP1 N17D en el tamaño de placas y en la resistencia a pH ácido de la cápsida del virus A) Análisis del tamaño de la placa de los virus recuperados de los diferentes clones infecciosos derivados de pMT28. Se infectaron células BHK-21 en medio semisólido y las placas de lisis se visualizaron 24 h p.i. tras tinción con cristal violeta. Se analizaron alrededor de 100 placas por cada virus, usando el programa Image J. El asterisco indica las diferencias estadísticamente significativas. B) Sensibilidad a pH ácido de los virus indicados en el panel A. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.14.2. La infectividad se calculó como el porcentaje de UFP recuperadas a cada pH con respecto a pH 7.2. La intersección entre la curva de inactivación y la línea discontinua indica el valor de pH_{50} .

5.3.5 Efecto de las mutaciones VP2 H145Y y VP1 N17D en la disociación de la cápsida viral tras tratamiento con pH ácido

La pérdida de la infectividad tras la incubación con tampones a pH ácido se ha asociado con la disociación física de la cápsida en sus subunidades pentaméricas (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Para comprobar si esto ocurría en el caso del mutante sr1, los virus recuperados de los clones infecciosos pMT28 (C-S8c1), pMT28 VP1 N17D (m6) y pMT28 VP2 H145Y VP1 N17D (sr1) fueron crecidos en células BHK-21 y purificados como se describe en el apartado 4.13. Los viriones purificados, cuyo coeficiente de sedimentación es de 140 S, fueron incubados a pH 7.2 o 6.0 durante 30 min y su integridad se determinó mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y análisis por *dot blot* del contenido de VP1 en cada fracción, tal y como se describe en el apartado 4.14.1. Los resultados

mostraron que a pH 6.0 tanto el virus C-S8c1, como el mutante VP1 N17D, se disociaron en pentámeros (coeficiente de sedimentación 12 S), lo que es compatible con los pH_{50} de estos virus (6.75 y 6.05, respectivamente) (Fig. 27A y B). En cambio, la preparación del virus sr1 conservó un alto contenido en viriones tras el tratamiento a pH 6 (Fig. 27C). Este resultado muestra que la cápsida del virus sr1 es más resistente a la disociación en pentámeros frente a pH ácido que la del virus parental m6, lo que es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de inactivación.

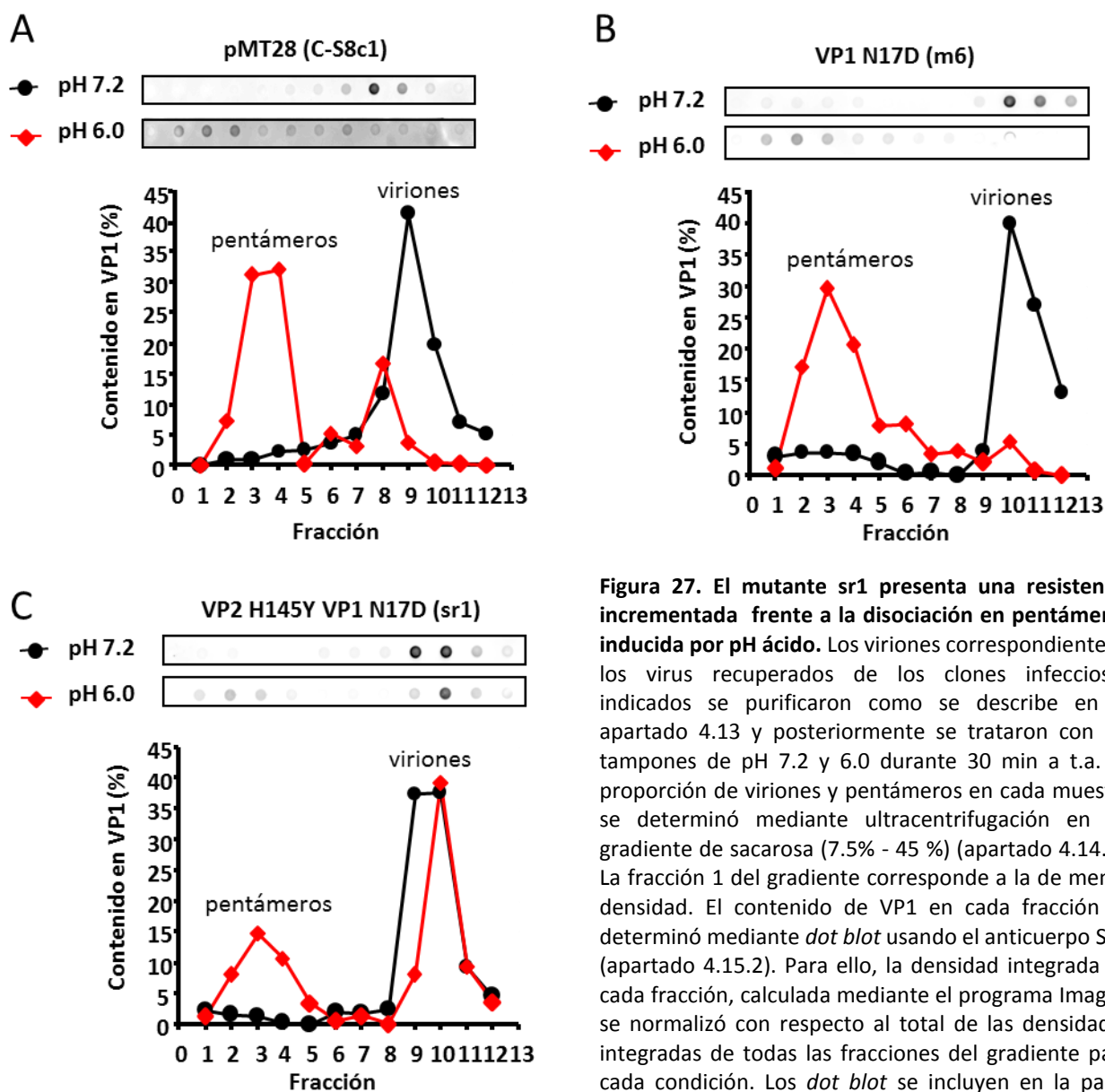


Figura 27. El mutante sr1 presenta una resistencia incrementada frente a la disociación en pentámeros inducida por pH ácido. Los viriones correspondientes a los virus recuperados de los clones infecciosos indicados se purificaron como se describe en el apartado 4.13 y posteriormente se trataron con los tampones de pH 7.2 y 6.0 durante 30 min a t.a. La proporción de viriones y pentámeros en cada muestra se determinó mediante ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa (7.5% - 45 %) (apartado 4.14.1). La fracción 1 del gradiente corresponde a la de menor densidad. El contenido de VP1 en cada fracción se determinó mediante *dot blot* usando el anticuerpo SD6 (apartado 4.15.2). Para ello, la densidad integrada en cada fracción, calculada mediante el programa ImageJ, se normalizó con respecto al total de las densidades integradas de todas las fracciones del gradiente para cada condición. Los *dot blot* se incluyen en la parte superior de cada gráfica.

RESULTADOS

5.3.6 Los viriones de los mutante sr1 y m6 presentan una estabilidad incrementada a 4 °C con respecto a los de C-S8c1

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la resistencia a pH ácido del mutante m6 se asocia con una sensibilidad menor a la inactivación térmica, cuando se compara con el virus C-S8c1 (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). La estabilidad térmica de los viriones de VFA es una propiedad importante para la inmunogenicidad de las vacunas frente a la FA, los cuales se basan en virus inactivado químicamente y cuya eficacia se reduce en caso de ruptura de la cadena de frío o tras almacenamiento a 4 °C durante periodos prolongados de tiempo (apartado 2.2.5.1). Para determinar si los virus sr1 y m6 eran más estables a 4 °C que el virus C-S8c1, los viriones se purificaron como se indica en el apartado 4.13 y se determinó su integridad mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (apartado 4.14.1). Inicialmente (tiempo 0), en las 3 preparaciones se observó un único pico de reactividad antigénica, correspondiente a la fracción de los viriones (Fig. 28A-C, tiempo 0). A continuación, los viriones se almacenaron a 4 °C durante 15 semanas, tras lo que se sometieron a una nueva centrifugación exactamente como la anterior, para determinar la cantidad de viriones conservados tras el almacenamiento. Como se muestra en la Fig. 28A, el almacenamiento prolongado redujo la proporción de viriones C-S8c1, provocando la aparición de un pico de pentámeros (coeficiente de sedimentación de 12 S), ausente anteriormente. Por otro lado, la proporción de viriones m6 y sr1 no varió apenas con el almacenamiento a 4 °C (Fig. 28B y C, 15 semanas). De hecho, mientras que para C-S8c1, el porcentaje de viriones se redujo a la mitad (Fig. 28A, panel derecho) tras 15 semanas de almacenamiento a 4 °C, este porcentaje se mantuvo casi constante para el virus m6 y sr1, con valores alrededor del 90% (Fig. 28B-C, panel derecho). Estos resultados sugieren que los mutantes m6 y sr1 incrementan de forma similar su estabilidad térmica a 4 °C con respecto a el virus parental C-S8c1.

RESULTADOS

5.3.7 Análisis del procesamiento del precursor VP0 en los viriones del mutante sr1

El residuo VP2 H145 mutado en el virus sr1 es equivalente al residuo VP2 H195 de poliovirus, tratándose de un residuo que está altamente conservado entre los picornavirus (Hindiyeh *et al.*, 1999). Se ha propuesto que este residuo participa en el corte autocatalítico dependiente de RNA del precursor VP0 que produce VP2+VP4 maduras (Curry *et al.*, 1997; Hindiyeh *et al.*, 1999). Se ha descrito también que tanto la sustitución en poliovirus de la His 195 por treonina, arginina, glicina o ácido aspártico, como la sustitución en VFA de la His 145 en VFA por lisina, serina y treonina eliminan el corte de VP0 y son letales para el virus (Hindiyeh *et al.*, 1999). Por esta razón, nos interesó analizar si el corte de VP0 en VP2+VP4 se producía correctamente en el mutante sr1. Para ello, viriones de C-S8c1, m6 y sr1, purificados como se describe en el apartado 4.13, fueron analizados mediante *Western blot* (apartado 4.15.1). Los resultados mostraron que los viriones del mutante sr1 contenían VP2 madura, no observándose trazas del precursor VP0 (Fig. 29). Por tanto, la sustitución de histidina por tirosina en el residuo VP2 145 de VFA no afecta el procesamiento proteolítico del precursor VP0.

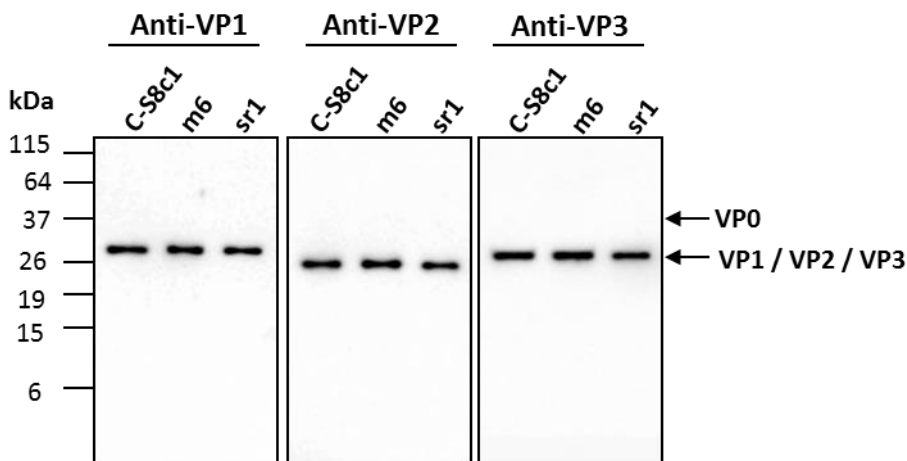


Figura 29. Análisis de las proteínas presentes en los viriones purificados de C-S8c1, m6 y sr1. Los viriones fueron purificados como se describe en el apartado 4.13. La fracción del gradiente que contenía el pico de viriones se resolvió en un gel de poliacrilamida y se analizó por *Western Blot*, usando los anticuerpos monoclonales SD6 (anti-VP1), 4A3 (anti-VP2) y 6C2 (anti-VP3), como se describe en el apartado 4.15.1. Se indica con una flecha el tamaño esperado para el precursor VP0 y para las proteínas maduras VP1, VP2 y VP3.

5.3.8 Infectividad específica de las poblaciones virales C-S8c1 y sr1

Estudios previos han demostrado la existencia de entre 82 y 2460 partículas físicas por cada UFP de VFA (Bachrach *et al.*, 1964), pudiendo esta relación variar con el tipo celular y el diseño del experimento. Con el objetivo de investigar si las sustituciones VP2 H145Y y VP1 N17D en el virus sr1, podían inducir una alteración en su relación placa/partícula, los virus C-S8c1 y sr1 se recuperaron de los clones infecciosos correspondientes y se usaron para infectar monocapas de células BHK-21. Tras

6 horas, se recogió el sobrenadante y se cuantificó el virus infeccioso producido. Asimismo, la cantidad de RNA total en las muestras se estimó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (apartado 4.11.5). Como se muestra en la Fig. 30, la infectividad específica determinada (UFP/número total de genomas víricos) fue similar entre el virus parental y el mutante VP2 H145Y VP1 N17D. Asumiendo que el número de moléculas de RNA se corresponde con el número de partículas físicas, estos resultados sugieren que las mutaciones presentes en el virus sr1 (VP2 H145Y VP1 N17D) no alteran la relación placa/partícula de VFA tal y como se ha determinado en este ensayo. Además los valores de infectividad específica obtenidos se aproximan a los anteriormente descritos para este virus (De la Higuera, 2014).

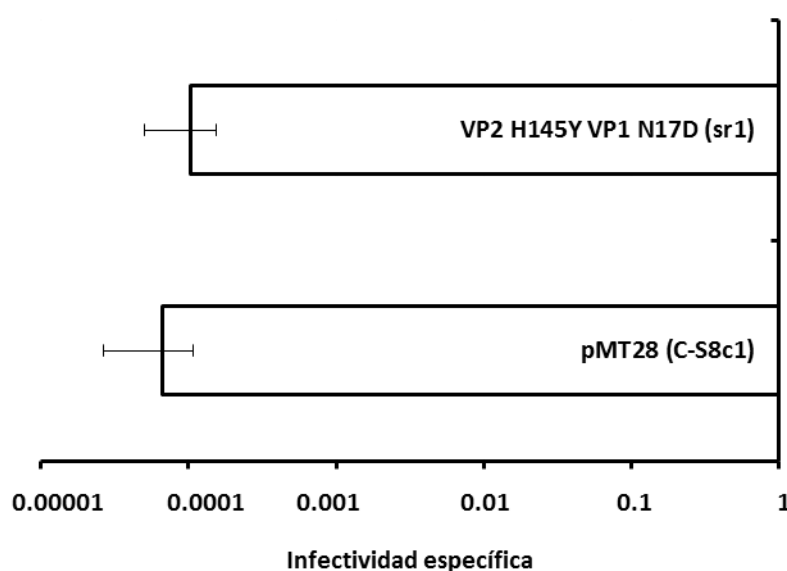


Figura 30. Infectividad específica de las poblaciones virales derivadas de los clones infecciosos pMT28 (C-S8c1) y pMT28 VP2 H145Y VP1 N17D. Se infectaron (m.d.i. 0.5 UFP/célula) células BHK-21 durante 6 h. A continuación, el virus extracelular se tituló y se cuantificó en paralelo el RNA viral, extraído con Trizol, mediante RT-PCR cuantitativa (apartado 4.10.5). La infectividad específica se expresa como el número de UFP dividido por el número de moléculas de RNA viral.

5.3.9 Progresión de la infección del mutante sr1 en poblaciones de PBMC enriquecidas en células dendríticas plasmacitoides

Las células epiteliales son la principal diana de VFA. Aunque este virus pueda replicar durante cortos periodos de tiempo a niveles muy bajos en macrófagos y CD, la infección es abortiva y termina con la eliminación del virus (Harwood *et al.*, 2008; Summerfield *et al.*, 2009). Se piensa que esto se debe, por un lado, a que estas células, especializadas en destruir los patógenos, tienen un sistema endosomal que se acidifica más rápidamente que los de otros tipos celulares y, por otro lado, a la extrema labilidad a pH ácido de las partículas de VFA (Rigden *et al.*, 2002; Vázquez-Calvo *et al.*, 2012). Debido a la mayor estabilidad a pH ácido de la cápsida del virus sr1, nos planteamos investigar si este mutante podía progresar en la ruta endocítica de células especialistas en la presentación de antígenos virales, como son las CD. Teniendo en cuenta la gran heterogeneidad de esta población

RESULTADOS

celular, decidimos centrarnos en un tipo específico de CD, las células dendríticas plasmacitoides (pCD). Las pCD son las únicas células del sistema inmune porcino que expresan TLR9 (Guzylack-Pirou *et al.*, 2004) y, por esta razón, responden de forma directa a la presencia de motivos CpG (DNA bacteriano) (Rothenfusser *et al.*, 2002), produciendo grandes cantidades de IFN- α (apartado 2.2.5.2). Primero se analizó la capacidad del virus parental C-S8c1 y del mutante sr1 para estimular la producción de IFN- α en una población de PBMC enriquecida en pCD. Esta población se seleccionó (apartado 4.16.2) usando un anticuerpo contra el marcador CD172, y por esta razón se denominaron CD172+. Los virus C-S8c1 y sr1 se recuperaron de los clones infecciosos correspondientes y se incubaron con las células CD172+ durante 16, 24 y 40 h. A diferencia de lo descrito en Guzylack-Pirou (2006) con VFA de serotipo O, los resultados indicaron que el VFA de tipo C (C-S8c1) es capaz de inducir IFN- α por sí solo, sin necesidad de ser opsonizado por anticuerpos (Fig. 31). El mutante sr1 indujo valores de IFN- α casi cuatro veces mayores respecto a C-S8c1. Las PBMC control estimuladas con CpG indujo valores de IFN- α muy altos, superiores a los incluidos en la recta patrón (Fig. 31).

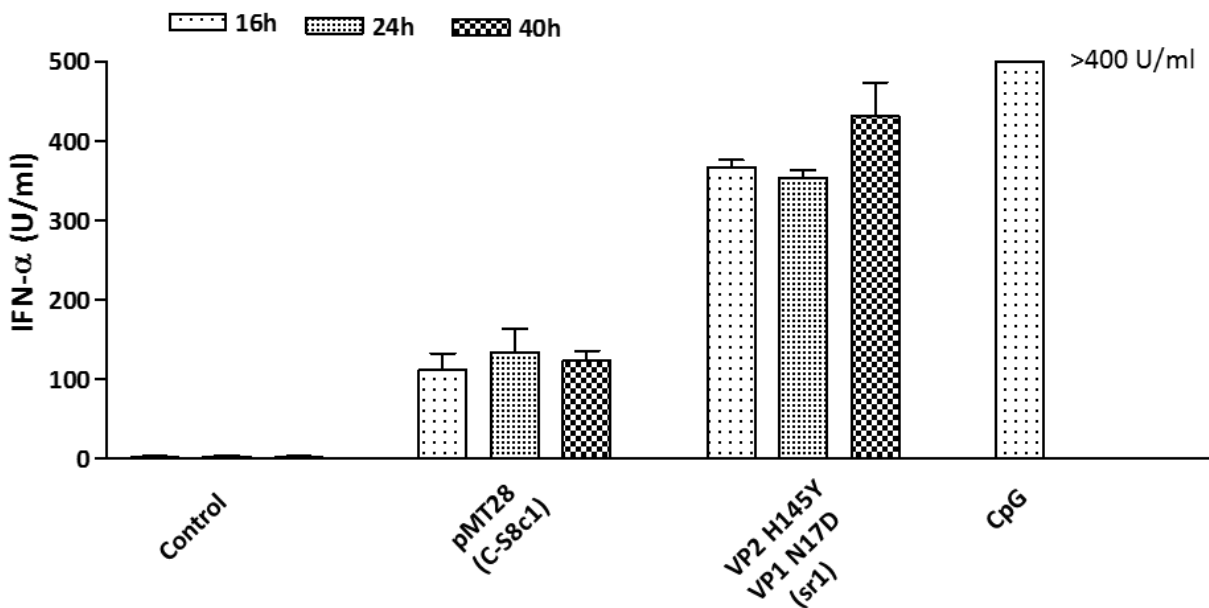


Figura 31. Producción de IFN- α en PBMC CD172+ en respuesta a los virus C-S8c1 y sr1. Las PBMC se obtuvieron como se describe en el apartado 4.16.1 y se enriquecieron en pDC mediante selección positiva con el marcador CD172 (apartado 4.16.2). Las células CD172+ se estimularon o no (control) con los virus C-S8c1 y sr1 recuperados de los clones infecciosos respectivos (m.d.i 0.5 UFP/célula). En este experimento se usó CpG (DNA bacteriano no metilado) como control positivo (16 h p.i., 2.5 μ g/ml). El IFN- α liberado al medio extracelular se analizó a las 16, 24 y 40 h post-estimulación mediante ELISA (apartado 4.18). Los valores de estimulación (U/ml) se obtuvieron mediante interpolación con una recta patrón (concentraciones IFN- α de 12.5 hasta 400 U/ml).

No se observaron cambios en la producción de IFN- α para ninguno de los virus con el tiempo (16, 24 y 40 h), lo que indica que la producción de esta citoquina alcanza su máximo a las 16 h post-

incubación. En conjunto, estos resultados demuestran que sr1 es mejor estimulador de pCD que C-S8c1.

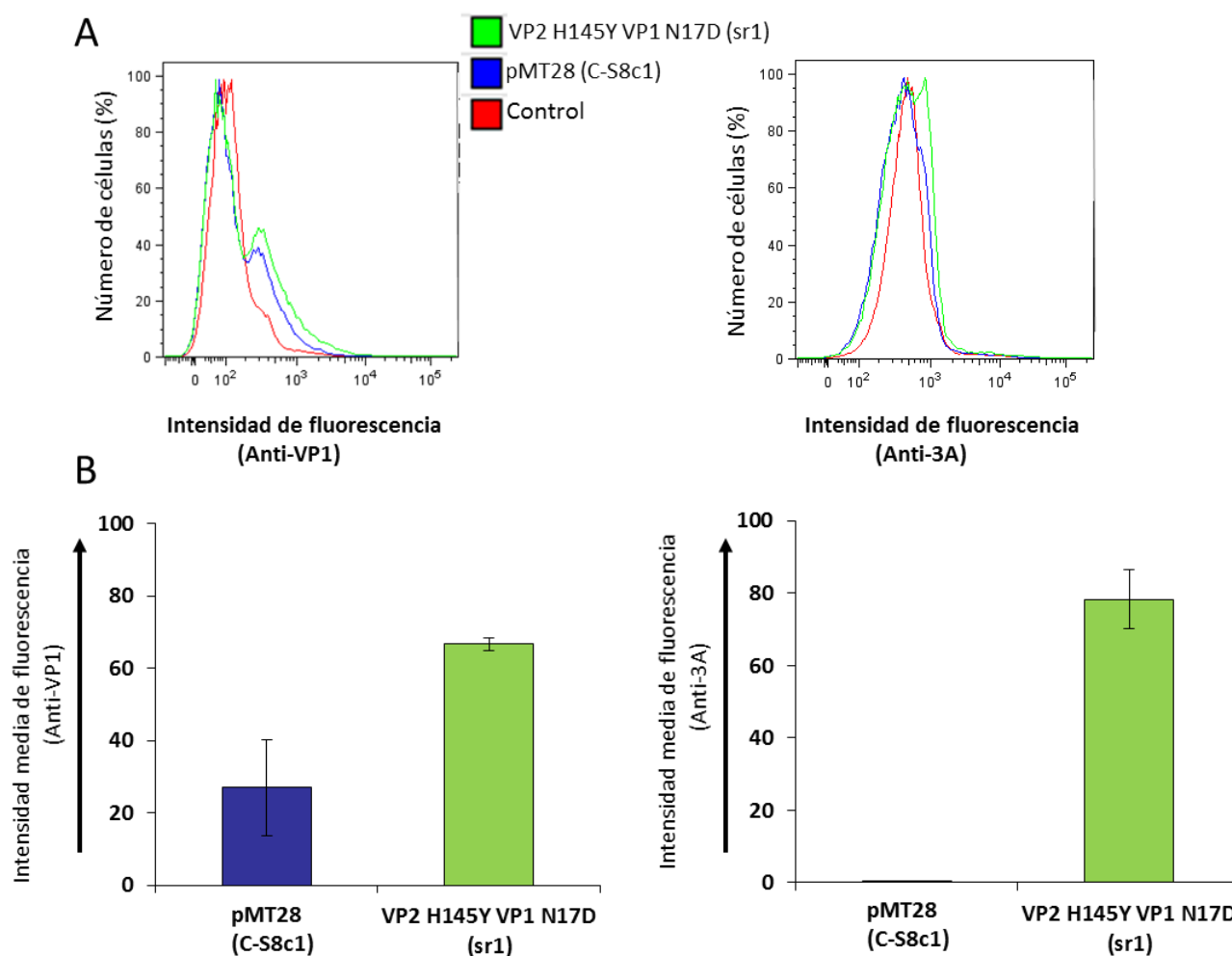


Figura 32. Detección de antígenos virales en pDC. Se incubaron células CD172+ con los virus C-S8c1 y sr1 recuperados de los clones infecciosos (m.d.i. 0.5 UFP/célula) o con medio solo (Control), mezcladas con un suero porcino anti-VFA (dilución 1:10) durante 4 h a 39 °C. La expresión de las proteínas virales VP1 y 3A se determinó tras 14 h empleando los anticuerpos primarios SD6 y 2C2, respectivamente, y los anticuerpos secundarios anti IgG1 Alexa Fluor 488 (SD6) y anti-IgG2a Alexa Fluor 647 (2C2). A) Histograma en el que se representa la intensidad de fluorescencia en función del número de eventos (células contadas por el citómetro) normalizados con respecto a la celda (*range* de intensidad de fluorescencia determinada) que contiene el mayor número de células. B) Media geométrica de las intensidades de fluorescencia restando el valor del fondo (Control).

A continuación, las células CD172+ se incubaron con los virus C-S8c1 y sr1 (recuperados de los respectivos clones infecciosos) en presencia de suero inmune porcino durante 4 h. Como se ha descrito en Guzylack-Piriou (2006), el suero policlonal inmune es capaz de opsonizar el virus, facilitando su entrada en las células a través de receptores Fc. Tras 14 h, se examinó la expresión de la proteína estructural VP1 y de la no estructural 3A mediante citometría de flujo. La proteína VP1 se

RESULTADOS

pudo detectar en ambos virus aunque de forma muy débil en el caso del virus parental C-S8c1 (Fig. 32A). Por otro lado, la proteína 3A se pudo detectar sólo en las células infectadas con el virus sr1 (Fig. 32B). Sin embargo, cuando los sobrenadantes de infección se titularon en células BHK-21 no se recuperó virus infeccioso en ningún caso. Estos resultados indican que el mutante sr1, bien por su estabilidad a pH ácido, o bien por otras características que le pueden conferir la presencia de las mutaciones VP2 H145Y y VP1 N17D, tiene una ventaja con respecto al virus parental para replicar en una población de PBMC enriquecida en pCD (CD172+). Sin embargo, esta replicación puede considerarse abortiva ya que no se pudo detectar virus infeccioso, de manera similar a lo descrito para VFA de tipo O (Guzylack-Piriou *et al.*, 2006).

5.3.9 Análisis del potencial inmunogénico del virus sr1

5.3.9.1 Las mutaciones VP2 H145Y y VP1 N17D no alteran la antigenicidad de los viriones

Uno de los problemas de las vacunas contra VFA basadas en virus inactivados químicamente es que a pesar de almacenarlas a baja temperatura (4 °C) pierden potencia inmunogénica con el tiempo, debido a la disociación de los viriones en pentámeros (apartado 2.2.5.1). Por esta razón, virus como sr1, con una mayor resistencia a la disociación a 4 °C (apartado 5.3.6), podrían ser alternativas vacunales más estables térmicamente. Teniendo esto en cuenta, se analizó la antigenicidad del doble mutante VP2 H145Y VP1 N17D (sr1) y de los mutantes simples VP2 H145Y y VP1 N17D, utilizando un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra cinco sitios antigénicos principales de C-S8c1 (Mateu, 1995). Los anticuerpos utilizados fueron SD6 (sitio A), 7JA1 (sitio C), 1G5 (sitio D₁), 2E5 (sitio D₂) y 5C4 (sitio D₃) (Lea *et al.*, 1994; Mateu, 1995; Mateu, 2004). Los mutantes fueron reconocidos por todos los anticuerpos ensayados (Fig. 33A), sugiriendo que las sustituciones VP2 H145Y y VP1 N17D, tanto en forma individual como combinada, no producen alteraciones importantes en la especificidad antigénica del virus sr1. Además, cuando se analizó la capacidad de dos de estos anticuerpos (SD6, 5C4) para neutralizar el virus mutante VP2 H145Y VP1 N17D, no se observaron diferencias con respecto al virus C-S8c1 (Fig. 33B-C). Estos resultados demuestran que las mutaciones VP1 N17D y VP2 H145Y no afectan a estos sitios antigénicos de VFA, haciendo interesante el estudio del potencial como vacuna de este mutante más estable.

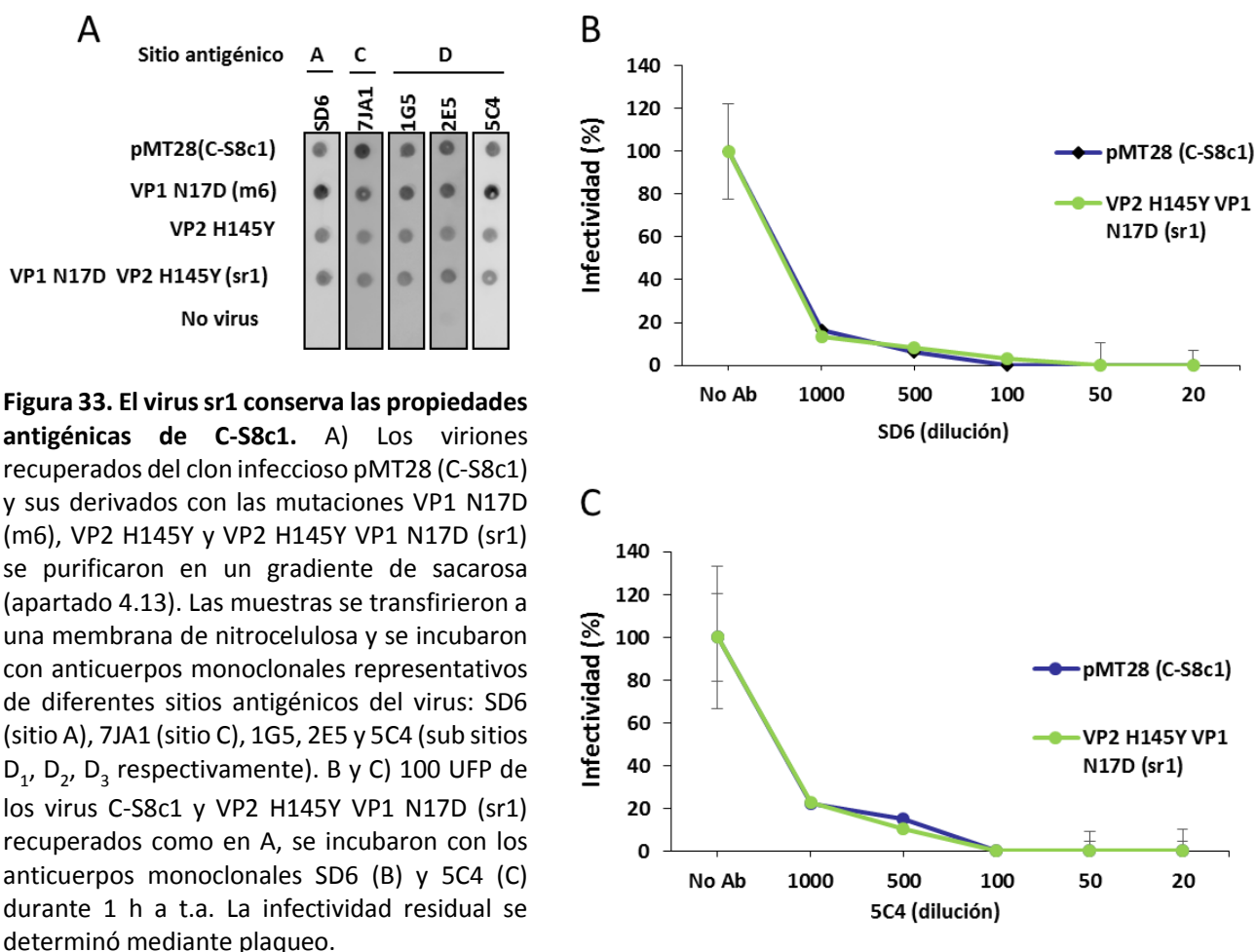


Figura 33. El virus sr1 conserva las propiedades antigénicas de C-S8c1. A) Los viriones recuperados del clon infeccioso pMT28 (C-S8c1) y sus derivados con las mutaciones VP1 N17D (m6), VP2 H145Y y VP2 H145Y VP1 N17D (sr1) se purificaron en un gradiente de sacarosa (apartado 4.13). Las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos monoclonales representativos de diferentes sitios antigénicos del virus: SD6 (sitio A), 7JA1 (sitio C), 1G5, 2E5 y 5C4 (sub sitios D₁, D₂, D₃ respectivamente). B y C) 100 UFP de los virus C-S8c1 y VP2 H145Y VP1 N17D (sr1) recuperados como en A, se incubaron con los anticuerpos monoclonales SD6 (B) y 5C4 (C) durante 1 h a t.a. La infectividad residual se determinó mediante plaqueo.

5.3.9.2 Análisis de la respuesta humoral inducida en cerdos inmunizados con C-S8c1 y el mutante sr1 (VP2 H145Y VP1 N17D) inactivados químicamente

Para profundizar en el análisis del potencial del mutante sr1 como vacuna en hospedadores naturales de VFA, se llevó a cabo un experimento de inmunización de cerdos con viriones inactivados de C-S8c1 y sr1 (apartado 4.20.1). Para ello, se usaron diez cerdos Landrace x Large White con alrededor de 6 semanas de edad, que se distribuyeron al azar en dos grupos. Un primer grupo (cerdos 4, 5, 6, 7, 12) se inoculó con viriones de C-S8c1, mientras que el segundo grupo (cerdos 8, 9, 10, 11, 13, 14) se inoculó con viriones de sr1 (apartado 4.20.2). Los viriones inactivados se emulsionaron con el adyuvante comercial Montanide ISA 25VG en dos dosis de 10 µg separadas por un intervalo de 28 días (Fig. 34). En estos ensayos, el antígeno viral se emulsionó con el adyuvante comercial Montanide ISA 25VG. Antes de la inmunización, se recogieron muestras de sangre de cada animal (suero pre-inmune), que se usaron como control negativo en todos los ensayos realizados. Los animales fueron sangrados durante el experimento a intervalos de alrededor de una semana, obteniéndose los sueros, con los que se llevaron a cabo experimentos de seroneutralizaciones y de detección por ELISA

RESULTADOS

de Ig totales y de los isotipos IgG1, IgG2, IgM y IgA. A los 70 días post-vacunación (p.v.), los animales se sacrificaron (Fig. 34).

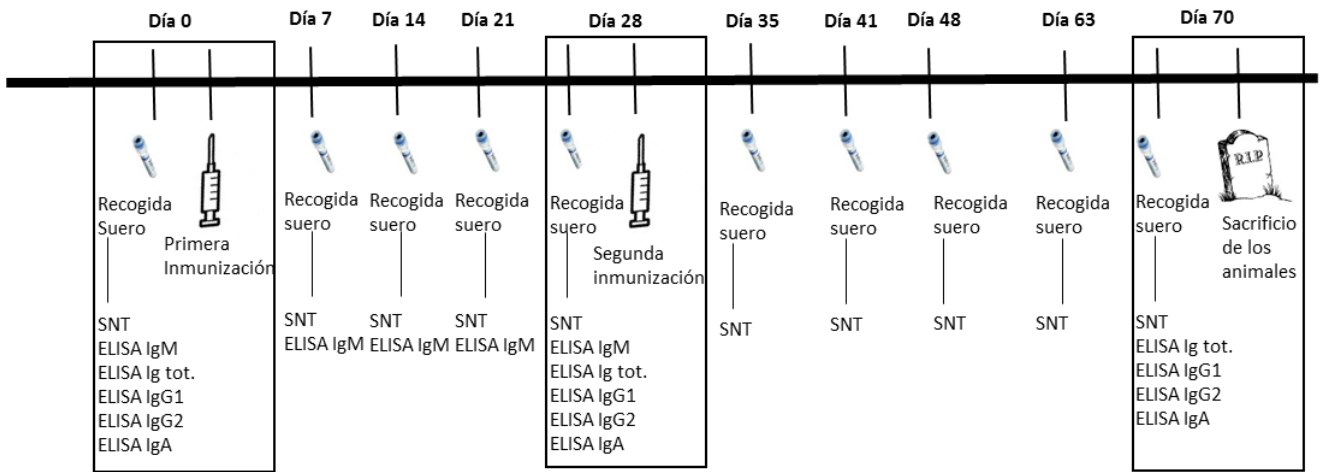


Figura 34. Esquema de la inmunización de cerdos con vacunas inactivadas preparadas a partir de los virus C-S8c1 y sr1. Los virus se recuperaron de los clones infecciosos respectivos. SNT (seroneutralización). Consultar el texto para una explicación detallada (apartado 5.3.9.2).

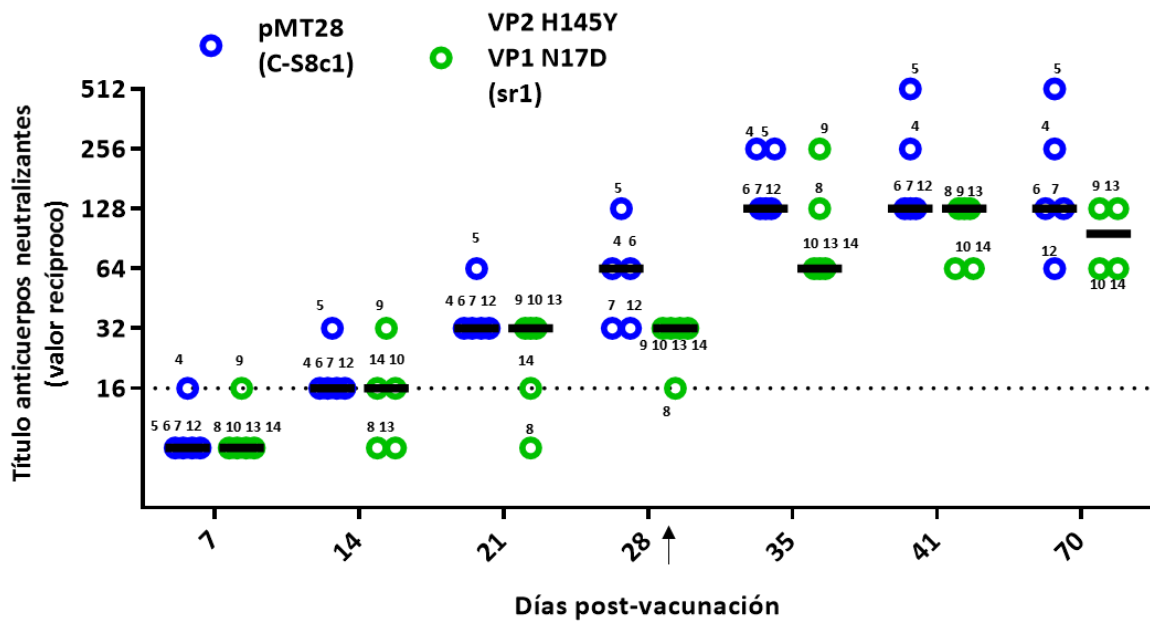


Figura 35. Anticuerpos neutralizantes anti-VFA en cerdos inoculados con vacunas inactivadas de los virus C-S8c1 y sr1. Se analizaron sueros de cerdos inmunizados con una vacuna experimental formulada a partir de virus C-S8c1 (4, 5, 6, 7, 12; indicados en azul) o de virus sr1 (8, 9, 10, 13 y 14; indicados en verde). Se utilizaron diluciones seriadas de los sueros que se incubaron con 100 TCID₅₀ de C-S8c1 durante 1 h a t.a., siendo a continuación incubados con células BHK-21. Cada suero se ensayó cuatro veces en la misma placa. A los tres días, las células se tiñeron con cristal violeta y se determinó el efecto citopático en cada pocillo. Los títulos se expresan con el valor recíproco de la dilución final más alta de suero capaz de neutralizar las 100 TCID₅₀ del virus en el 50% de los pocillos. La línea discontinua indica el límite de detección del ensayo (1:16). Cuando no se detectó ninguna dilución neutralizante (< 1:16) se asignó al suero un valor arbitrario de 8. Las líneas horizontales indican las medianas de los títulos en cada grupo. La flecha indica el día de la segunda inmunización (día 28 tras la primera inmunización).

En la mayoría de los animales no fue posible detectar anticuerpos neutralizantes a 7 días tras la administración de la primera dosis de vacuna (C-S8c1: 5, 6, 7, 12; VP2 H145Y VP1 N17D: 8, 10, 13, 14) (Fig. 35). A lo largo de las 3 semanas siguientes (días 14, 21 y 28 p.v.) todos los animales alcanzaron títulos detectables de anticuerpos neutralizantes, siendo los de aquellos inmunizados con el mutante VP2 H145Y VP1 N17D ligeramente menores, aunque no significativamente diferentes (Fig. 35). Tras la segunda dosis de virus inactivado que se suministró a día 28 p.v., se observó para todos los animales un aumento de los títulos. Durante las dos semanas posteriores (días 35 y 41), la mayoría alcanzó niveles de anticuerpos neutralizantes entre 1:64 y 1:128 (Fig. 35). Los títulos se mantuvieron en estos niveles hasta el final del experimento (70 días p.v.), no observándose diferencias significativas entre animales inmunizados con el mutante sr1 o con el virus C-S8c1.

Cuando se examinaron las inmunoglobulinas (Ig) totales anti-VFA en los días 28 y 70 (últimos días después de la primera y segunda dosis, respectivamente), los dos grupos mostraron títulos similares, alcanzando valores superiores a 1:1000 tras la segunda dosis (Fig. 36, Ig totales). A continuación, se determinó la producción de anticuerpos específicos frente al VFA de isotipos IgG1, IgG2 e IgA a los 28 y 70 días p.v. Los niveles de anticuerpos IgG1 fueron muy similares a los de IgG totales (Fig. 36, IgG1), en cambio los títulos de IgG2 se detectaron solo a 70 días p.v. (después de la segunda inmunización) y fueron más bajos que los de IgG1 (Fig. 36, IgG2). Con la IgA, se observó una situación parecida a la de IgG2 (Fig. 36, IgA). Aunque en el grupo inmunizado con el virus sr1 los títulos fueron, en general, ligeramente menores, no se apreciaron diferencias significativas con ninguno de los isotipos analizados. La producción de IgM se valoró tras 7, 14, 21 y 28 días p.v. ya que este tipo de inmunoglobulina sólo aparece tras la primera inmunización y su pico precede al de las IgG. Dos de los animales inmunizados con el virus C-S8c1 (cerdos 5 y 6) mostraron el máximo de IgM a los 7 días p.v., mientras que los 3 animales restantes del mismo grupo (cerdo 4, 7, 12), lo mostraron a los 14 días p.v. (Fig. 36, IgM). Dos de los animales inmunizados con el virus sr1 mostraron, también, un pico de IgM a los 7 días p.v., aunque los niveles fueron menores que los de los cerdos 5 y 6, inmunizados con C-S8c1 (Fig. 36, IgM). A tiempos posteriores, los niveles de IgM se mantuvieron indetectables (día 14 y 28 p.v.) o en el límite de detección (día 21 p.v.) en todos los animales inoculados con el virus sr1 (Fig. 36, IgM). Las diferencias de los títulos de IgM entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas sólo a día 14 (Fig. 36, IgM). De estos resultados se puede concluir que el virus sr1 inactivado es capaz de inducir respuesta humoral en cerdos similar a la que estimula el virus parental, aunque los títulos de anticuerpos inducidos tienden a ser ligeramente más bajos.

RESULTADOS

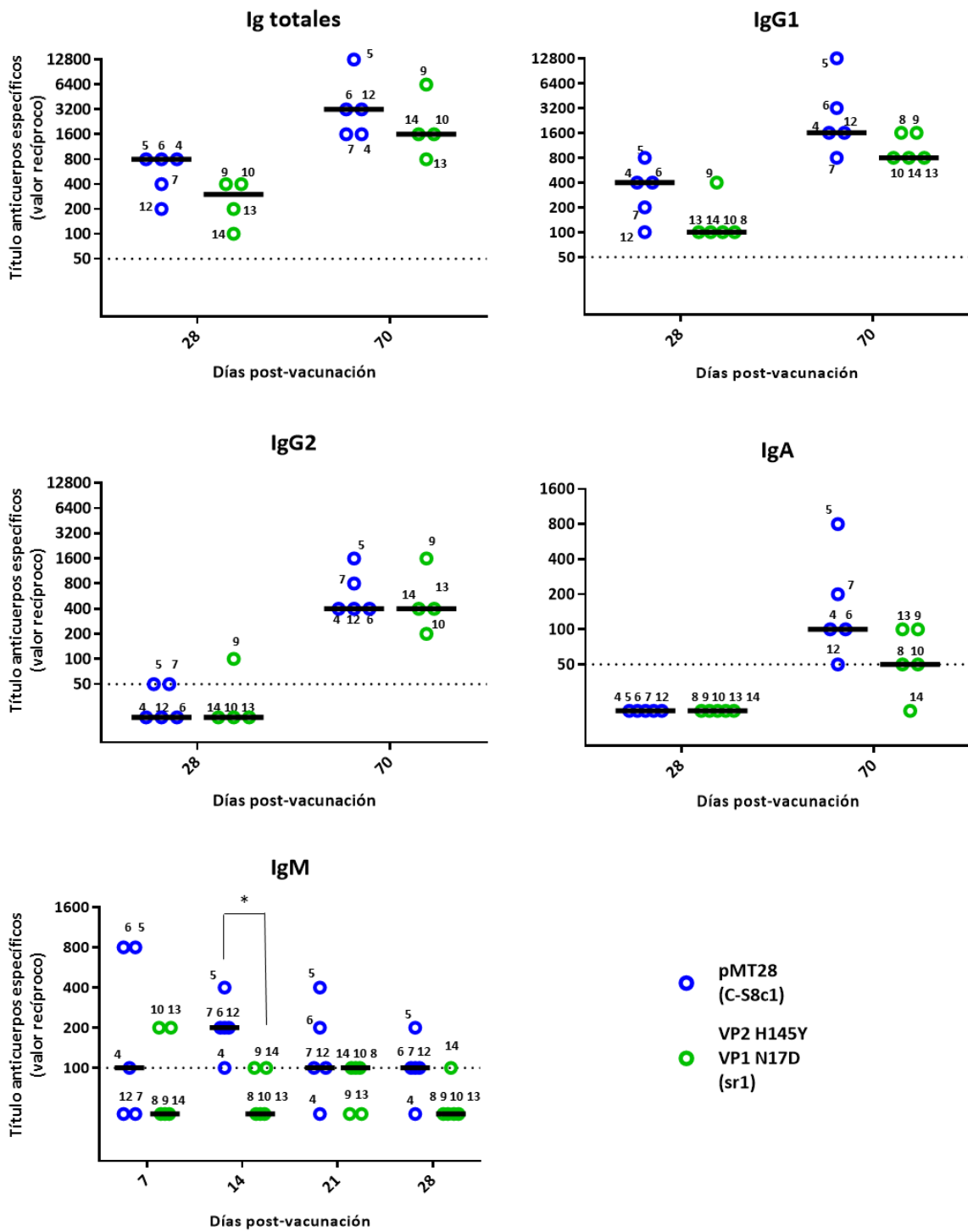


Figura 36. Anticuerpos anti-VFA totales y específicos de isotipo (IgG1, IgG2, IgM y IgA) en cerdos inoculados con vacunas inactivadas de los virus C-58c1 y sr1. Los sueros de los cerdos inmunizados como se describe en la Fig.35 se analizaron por ELISA empleando diluciones seriadas en base 2. La densidad óptica se midió a 450 nm (apartado 4.9.14.2). En cada dilución se restó el valor de la densidad óptica del suero del mismo animal antes de la vacunación (tiempo 0). Los títulos de los anticuerpos se expresa como el valor recíproco de la última dilución que dio un valor mínimo 3 veces superior a la densidad óptica del tampón sin diluir (fondo). La línea discontinua representa el límite de detección que fue de 1:50 para IgG totales, IgG1, IgG2, IgA y 1:100 para IgM. Cuando no se detectó título de anticuerpos, se asignó al suero examinado un valor arbitrario de 20 (IgG totales, IgG1, IgG2, IgA) o 45 (IgM). Las líneas horizontales indican las medianas de los títulos en cada grupo. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

5.4 Selección de mutantes de VREA con sensibilidad diferencial a pH ácido

5.4.1 Aislamiento y caracterización de VREA mutantes resistentes a NH₄Cl

En los apartados 5.1 y 5.3 se han identificado algunas posiciones en la cápsida de VFA que modulan su estabilidad, que se añaden a las ya conocidas por trabajos anteriores (apartado 2.2.6.1.2). Además se ha puesto en evidencia que la estabilidad a pH ácido de VFA se relaciona de forma directa con la sensibilidad a drogas que inhiben la acidificación endosomal (apartado 5.2.1), lo que es consecuencia de que su mecanismo de desencapsidación dependa de la acidificación del pH endosomal. Con este hilo conductor, el último objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en extender este tipo de análisis a VREA, otro aftovirus que produce un cuadro respiratorio en caballos (apartado 2.3), cuya desencapsidación es también dependiente de pH ácido y por lo tanto sensible a drogas que inhiben la acidificación endosomal (Groppelli *et al.*, 2010). Para identificar las regiones implicadas en los cambios conformacionales necesarios para la desencapsidación de VREA, nos planteamos aislar mutantes resistentes a inhibidores de la acidificación endosomal, siguiendo una estrategia similar a la utilizada para VFA (apartado 5.1.4). Para ello, se infectaron células Vero tratadas o no (control) con 10 mM NH₄Cl con diluciones seriadas de VREA en medio semisólido. Tras 72 h de infección, el número de UFP desarrolladas en las monocapas tratadas fue alrededor de 10 000 veces inferior que en las monocapas control. Se recogieron los virus contenidos en 16 placas de lisis desarrolladas en presencia de NH₄Cl, que se amplificaron en medio líquido en presencia de 10 mM NH₄Cl. Tres de los virus amplificados, denominados RC3, RC8 y RC19, mostraron una resistencia incrementada al tratamiento con 5 ó 10 mM NH₄Cl, en comparación con el VREA parental (Fig. 37A). Los mutantes RC3 y RC8 mostraron una resistencia mayor a ambas concentraciones de la droga que RC19, para el que no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al VREA en presencia de 10 mM NH₄Cl. Como se ha comentado anteriormente los mutantes resistentes a NH₄Cl en VFA son más sensibles a pH ácido (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). Esto se debe a que el mecanismo de resistencia a NH₄Cl se basa en el aumento del pH necesario para la desencapsidación del virus, gracias a la adquisición de mutaciones que aumentan la labilidad de la cápsida. Para estudiar si un fenómeno similar ocurría en el VREA, se analizó la sensibilidad de los mutantes RC3, RC8 y RC19 y del virus parental a pH ácido (apartado 4.14.2). En estos experimentos, se incluyó el enterovirus CVB5 como control de un virus estable en un amplio rango de pH, cuya infectividad se mantuvo constante a los distintos valores de pH analizados (Fig. 37B). El VREA perdió el 50% de su infectividad a pH 5.8, decayendo a medida que se acidificó el pH hasta reducirse en torno al 10% del valor inicial

RESULTADOS

a pH 5. Los tres virus mutantes fueron más sensibles a la incubación con tampones de pH ácido que el VREA parental (pH_{50} de 6.24 para RC3 y RC8 y de 5.96 para RC19). Cabe resaltar que RC19 fue el mutante menos sensible al tratamiento con pH ácido, lo que es compatible con su menor resistencia a NH_4Cl (Fig. 37B). En conjunto, estos resultados apoyan la existencia de una relación entre la resistencia a NH_4Cl y la sensibilidad a pH ácido de VREA, de manera similar a lo descrito para VFA.

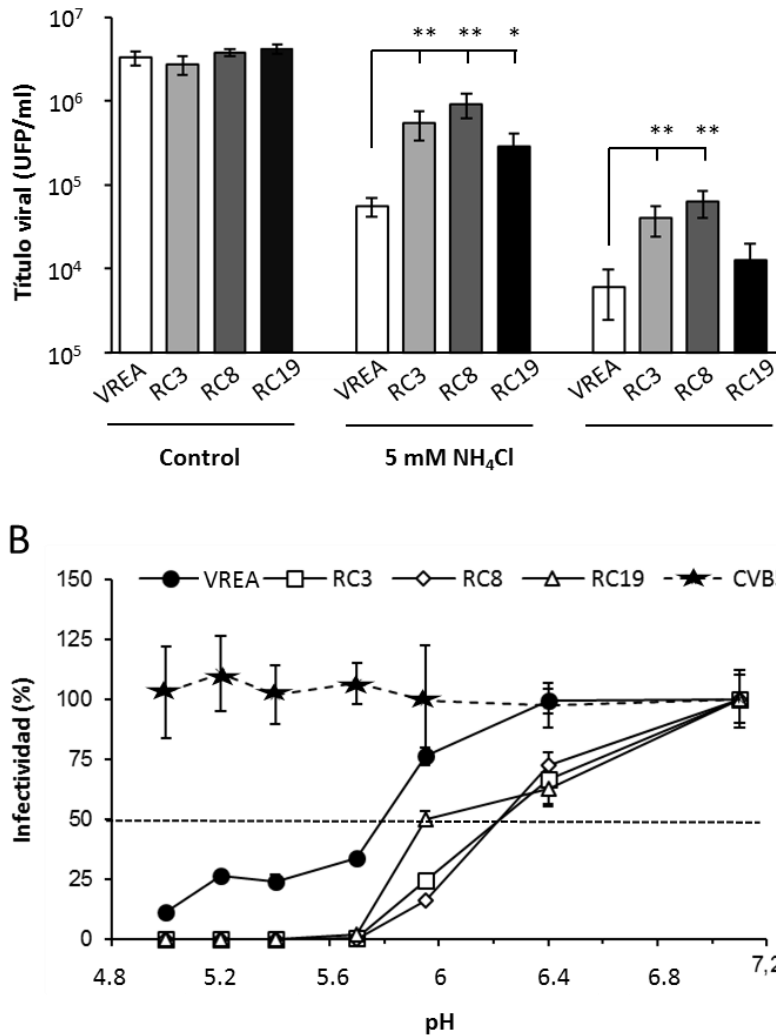


Figura 37. Los mutantes de VREA con resistencia incrementada a NH_4Cl muestran una mayor labilidad a pH ácido. A) Análisis de la resistencia a la inhibición de la acidificación endosomal con NH_4Cl de los mutantes RC3, RC8 y RC19. Se infectaron (m.d.i 0.5 UFP/célula) monocapas de células Vero, tratadas o no con NH_4Cl , con VREA parental y sus variantes RC3, RC8 y RC19. La producción viral se determinó a las 24 h p.i. B) Perfiles de sensibilidad a pH ácido de los virus resistentes a NH_4Cl . El ensayo se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.14.2. La infectividad se determinó como el porcentaje de UFP recuperadas a cada pH respecto a las obtenidas a pH 7.2. La intersección entre las curvas y la línea discontinua indica el valor de pH_{50} .

5.4.2 Selección y caracterización de mutantes de VREA con resistencia a pH ácido incrementada

Dado que los mutantes de VREA resistentes a NH_4Cl eran más sensibles a pH ácido, nos planteamos estudiar el fenómeno opuesto, es decir, si mutantes resistentes a pH ácido resultaban más sensibles a NH_4Cl . Para ello, siguiendo una estrategia similar a la descrita para el aislamiento de mutantes de VFA resistentes a pH ácido (apartado 5.3.1), se incubaron 10^6 UFP de VREA a pH 5 durante 1 h. Con estas muestras se infectaron monocapas de células Vero subconfluentes dejando transcurrir la infección hasta observar efecto citopático completo (normalmente 48 h). De esta manera, se llevaron

a cabo en paralelo dos series independientes de estos ciclos de incubaciones con pH ácido e infección, denominadas Res1 y Res2. Tras 10 ciclos, se examinó la resistencia a pH 5.0 de las poblaciones Res1 y Res2, comparándose con la del virus parental (Fig. 38A). En estos experimentos se observó que tras la incubación con pH 5, las poblaciones Res1 y Res2 mantuvieron una infectividad significativamente mayor que el VREA parental. Cuando se examinó la resistencia de estas poblaciones a la inhibición de la acidificación endosomal, utilizando NH₄Cl, se observó que Res1 y Res2 fueron significativamente más sensibles a la inhibición con este compuesto que el virus parental (Fig. 38B). Estos resultados confirman que, al igual que ocurre con VFA, los mutantes de VREA resistentes a pH ácido son más sensibles a la inhibición de la acidificación endosomal debido a que desencapsidan a un pH más ácido.

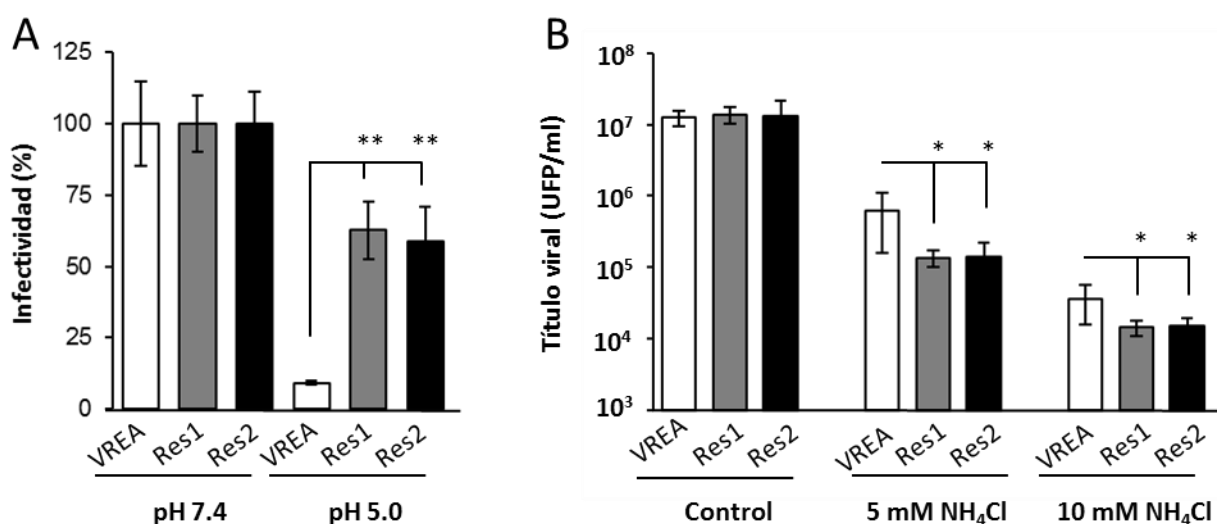


Figura 38. Los mutantes de VREA con resistencia incrementada a pH ácido muestran una mayor sensibilidad a NH₄Cl. A) Resistencia a pH 5 de los mutantes Res1 y Res2. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.14.2. La infectividad se determinó como el porcentaje de UFP recuperadas a pH 5 respecto a las obtenidas a pH 7.4. B) Sensibilidad a NH₄Cl de los virus resistentes a pH 5. Se infectaron (m.d.i. 0.5 UFP/célula) monocapas de células Vero, tratadas o no con NH₄Cl, con VREA y sus derivados Res 1 y Res2. El título viral se determinó a las 24 h p.i.

5.4.3 Bases moleculares de la sensibilidad a pH ácido de los mutantes de VREA seleccionados

La secuencia nucleotídica completa de la región codificante de las proteínas de la cápsida de los virus sensibles a pH ácido (resistentes a NH₄Cl) RC3, RC8 y RC19, así como de los resistentes a pH ácido (sensibles a NH₄Cl) Res1 y Res2 fue determinada y comparada con la del VREA parental. El análisis de estas secuencias reveló que cada uno de los virus había seleccionado en su secuencia consenso una única sustitución nucleotídica no sinónima. Además, el mutante RC19 presentó también una sustitución silenciosa en esta región. En todos los casos, las sustituciones de aminoácido encontradas se localizaron en la proteína VP3 y fueron diferentes en cada uno de los tres mutantes sensibles a pH

RESULTADOS

ácido: VP3 F53Y, R203C e I109V en los mutantes RC3, RC8 y RC19, respectivamente (Tabla V). Por otro lado, los virus Res1 y Res2 resistentes a pH ácido, correspondientes a dos series de pases individuales realizadas en paralelo, seleccionaron la misma sustitución nucleotídica responsable del cambio VP3 N105S (Tabla V). El análisis de las secuencias de los pases más tempranos, reveló que esta mutación era ya dominante en los pase 6 y 7 para Res1 y Res2, respectivamente. Cuando se analizó la conservación de los residuos mutados en los diferentes aislados de VREA empleando un alineamiento de la secuencia completa de la proteína VP3 de 25 aislados de VREA de diferente procedencia, se observó que todas las sustituciones aminoacídicas encontradas afectaban a residuos totalmente conservados en la cápsida.

Tabla V. Sustituciones seleccionadas en la cápsida de mutantes de VREA con diferente sensibilidad a pH ácido

| Fenotipo | Mutante | Mutaciones seleccionadas en la region codificante de la cápsida ^a | |
|--|---------|--|--------------------------|
| | | Sustitución nucleotídica | Sustitución aminoacídica |
| Sensible a pH ácido (resistente a NH ₄ Cl) | RC3 | T1088A | VP3 F53Y |
| | RC8 | C1537T | VP3 R203C |
| | RC19 | A1255G | VP3 I109V |
| Resistente a pH ácido (sensible a NH ₄ Cl) | Res1 | T1758C | Sinónima |
| | Res2 | A1244G | VP3 N105S |
| | Res2 | A1244G | VP3 N105S |

^a La numeración corresponde a la cápsida de VREA, aislado NM11/67 (GenBank FJ607143).

Las estructuras de la cápsida de VREA tanto en su forma nativa como en la correspondiente cápsida vacía generada por tratamiento con pH ácido que se corresponde con el intermedio de desencapsidación de este virus, han sido resueltas (Tuthill *et al.*, 2009) (Fig. 39A y B). Todas las sustituciones de aminoácido de los mutantes sensibles a pH ácido (VP3 F53Y, R203C y I109V) se localizan en la misma región de la cápsida: la interfaz intraprotomérica entre VP3 y VP2. Además, la mutación encontrada en las dos poblaciones resistentes a pH ácido (VP3 N105S) se localiza muy cerca de ellas, también en una interfaz intraprotomérica, situada, en este caso, entre las proteínas VP3 y VP1.

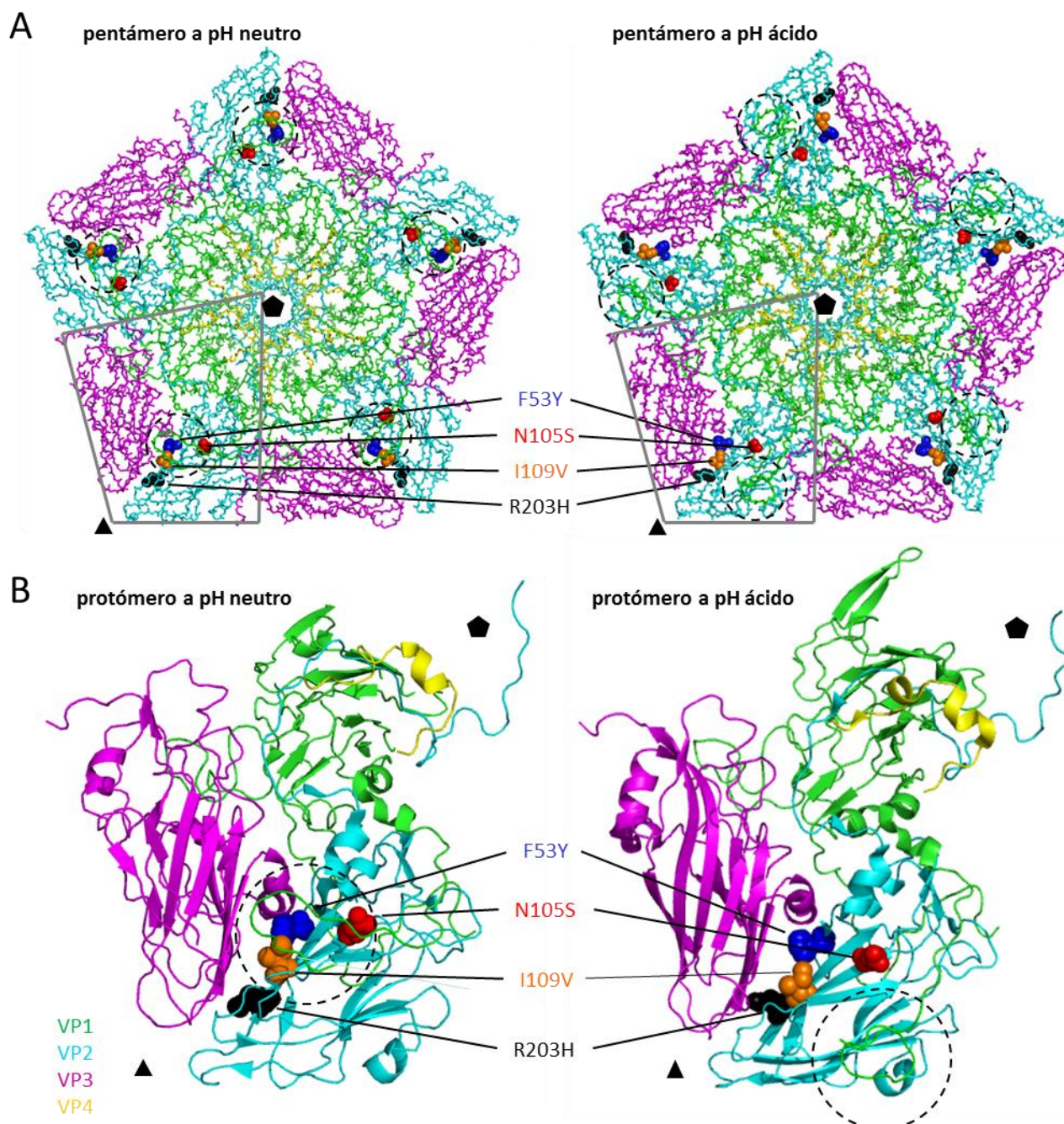


Figura 39. Localización de las sustituciones que alteran la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VREA. A) Representación de una subunidad pentamérica de VREA a pH neutro (panel izquierdo), construida a partir de la estructura con código PDB 2WFF y a pH ácido (panel derecho), construida a partir de la estructura con código PDB 2WS9. Las posiciones mutadas se indican con esferas. La línea gris delimita un protómero. Los círculos discontinuos indican la localización del extremo N-terminal de VP1. Las cadenas laterales de los aminoácidos han sido omitidas para simplificar la figura. B) Representación de la estructura secundaria del protómero a pH neutro y a pH ácido. Los residuos mutados se indican con esferas. Los círculos discontinuos indican la localización del extremo N-terminal de VP1. Los ejes de simetría 5 y 3 se indica con pentágonos y triángulos, respectivamente. VP1 en verde, VP2 en magenta, VP3 en cian y VP4 en amarillo.

En la estructura de VREA a pH neutro, todos los residuos mutados se sitúan muy cerca del N-terminal de VP1, que se desplaza de su posición en la estructura a pH ácido (comparar círculos del panel

RESULTADOS

derecho e izquierdo en las Fig. 39A-B). Cabe destacar que el extremo N-terminal de VP1 sufre importantes cambios conformacionales tras la exposición de las partículas de VREA a pH ácido (Tuthill *et al.*, 2009). Todas estas sustituciones encontradas en los mutantes de VREA afectaron a residuos que tienen interacciones con otros residuos de VP2 y, en menor medida, con el extremo N-terminal de VP1 (Tabla VI). El hecho de que algunas de estas interacciones se pierdan a pH ácido o se sustituyan por otras, sugiere que los reemplazamientos observados pueden estar alterando este patrón de interacciones, modulando así la estabilidad de la cápsida a pH ácido. En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína VP3 y, en particular su interfaz con VP2 y VP1, juega un papel fundamental en el control de la estabilidad de la cápsida de VREA.

5.4.4 *Fitness* de los mutantes de VREA con sensibilidad alterada a pH ácido

Con objeto de determinar si las mutaciones que conferían resistencia a pH ácido o NH₄Cl suponían un coste de *fitness* para el VREA, se analizó el tamaño de placa y las curvas de crecimiento de los mutantes RC3, RC8, RC19, Res1, Res2. Los resultados mostraron que el fenotipo de placa era similar en todos los virus (Fig. 40A). Además, no se encontraron diferencias marcadas en la curva de crecimiento de los virus, aunque se pudo observar una tendencia en los mutantes a alcanzar títulos ligeramente menores que los del virus parental (Fig. 40B).

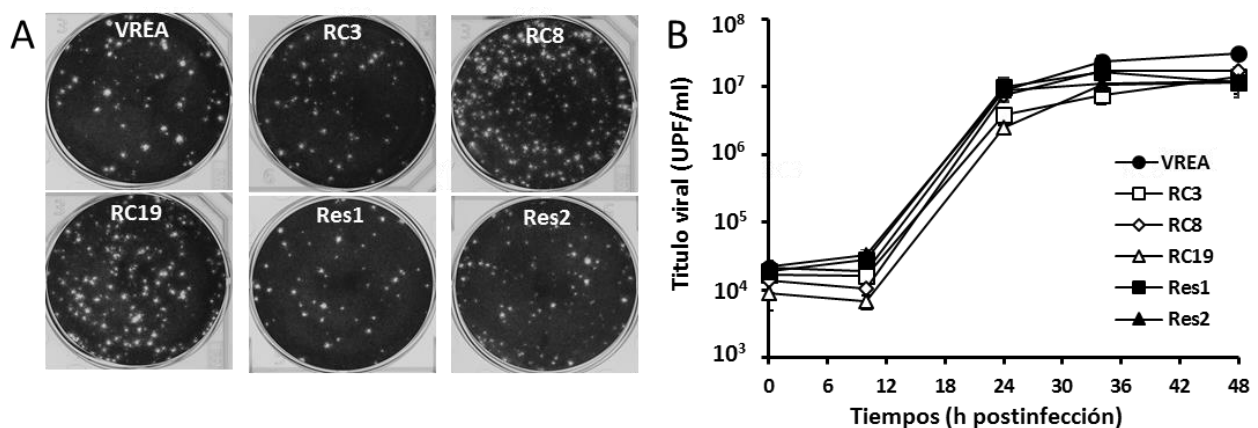


Figura 40. Tamaños de placas y curva de crecimiento y de los mutantes de VREA con sensibilidad alterada a pH ácido. A) Placas de lisis producidas por el virus parental (VREA), los mutantes sensibles a pH ácido (RC3, RC8, RC19) y los resistentes a pH ácido (Res1 y Res2). Se infectaron células Vero en medio semisólido, tras 60 h las células se fijaron y tñieron con cristal violeta B) Curva de crecimiento de los virus indicados en el A. Las células Vero fueron infectadas (m.d.i. 1 UFP/célula) y el virus extracelular se tituló a los tiempos indicados.

Por otro lado, con el fin de analizar la estabilidad genética de estas mutaciones, cada uno de los virus mutantes (RC3, RC8, RC19, Res1 y Res2) se propagó 10 veces en ausencia de presión selectiva, secuenciándose la región codificante las proteínas de la cápsida viral. En todos los casos, esta

secuencia se mantuvo constante, no observándose reversión de las mutaciones ni aparición de posibles mutaciones compensatorias. Estos resultados sugieren que las sustituciones de aminoácido que presentan las variantes de VREA con sensibilidad diferencial a pH ácido no comprometen la infectividad del virus en cultivos celulares.

6. Discusión

6.1 Análisis de las mutaciones que alteran la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VFA

La cápsida protege el genoma viral de agresiones externas y lleva a cabo funciones vitales como la unión al receptor para la entrada del virus en la célula hospedadora o la liberación del genoma viral (Mateu, 2013). La desencapsidación es una etapa clave del ciclo viral y una diana para las terapias antivirales (De Colibus *et al.*, 2014; Fox *et al.*, 1986; Lacroix *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Rosenwirth *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1986). Por lo tanto entender las bases moleculares que controlan la estabilidad de la cápsida de VFA es de fundamental importancia tanto para ampliar el conocimiento de la biología básica de este patógeno como para facilitar el desarrollo de nuevas estrategias antivirales, así como la mejora de las vacunas existentes. En particular, los problemas relacionados con la inestabilidad de los viriones contenidos en las preparaciones de las vacunas clásicas contra este patógeno (apartado 2.2.5.1) han hecho dirigir muchos esfuerzos hacia la generación de mutantes de VFA más estables que, conservando todas las propiedades inmunogénicas, pudieran usarse como alternativas vacunales. Por ejemplo, aprovechando la información disponible sobre la estructura cristalográfica de la cápsida de diferentes aislados de VFA, mediante diseño racional y mutagénesis dirigida (normalmente en residuos situados cerca del borde interpentamérico), diferentes autores han logrado aumentar la estabilidad (térmica y a pH ácido) de la cápsida viral (Biswal *et al.*, 2016; Kotecha *et al.*, 2015; Mateo *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2013; Rincón *et al.*, 2014). Por otro lado, en otros laboratorios incluyendo el nuestro, con el fin de profundizar en los mecanismos de desencapsidación del virión, se ha seguido un abordaje alternativo basado en someter el virus a presión selectiva empleando tratamientos que seleccionan mutantes con sensibilidad alterada a pH ácido. De esta manera, se han seleccionado en presencia de NH_4Cl virus con cápsidas más inestables (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012), así como, tras incubación con pH ácido, virus con fenotipo opuesto (Liang *et al.*, 2014; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Wang *et al.*, 2014). Estas estrategias han permitido generar una amplia batería de mutantes con diferentes grados de sensibilidad frente a pH ácido. En esta Tesis Doctoral se ha continuado explotando estas estrategias, lo que ha permitido identificar regiones clave que modulan la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VFA. A continuación se discute en detalle cada uno de los mutantes aislados y caracterizados.

DISCUSIÓN

6.1.1 La región interpentamérica y el N-terminal de VP1 modulan la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VFA

La sustitución VP1 N17D confiere resistencia a pH ácido a VFA de tipo C, O y Asia-1 (Liang *et al.*, 2014; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Wang *et al.*, 2014). Esto indica que el residuo VP1 N17, situado en la parte interna de la cápsida, es importante para la estabilidad a pH ácido de VFA. Por otro lado, las interacciones entre los residuos localizados en la región interpentamérica también son de crucial importancia para la estabilidad de la cápsida de VFA (Mateo *et al.*, 2003). De hecho, datos previos habían demostrado que mutaciones en la región interpentamérica pueden tanto desestabilizar (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012) como estabilizar la cápsida de VFA (Porta *et al.*, 2013). Para profundizar en los mecanismos por los que estas regiones de la cápsida regulan la estabilidad de la partícula viral, primero nos planteamos analizar si la mutación VP1 N17D, localizada en una región interna de la cápsida, podía compensar el fenotipo de labilidad a pH ácido conferido por las mutaciones VP3 A116V y A118V, que se localizan muy cerca del borde interpentamérico. Para ello, utilizando un clon infeccioso de VFA, se construyeron dos virus que combinaban una sustitución en un residuo cercano al borde interpentamérico (VP3 A116V o VP3 A118V) y la sustitución en la región interna de la cápsida VP1 N17D. El análisis de sensibilidad a pH ácido ha revelado que el fenotipo de resistencia a pH ácido de estos virus (VP3 A116V VP1 N17D y VP3 A118V VP1 N17D) es muy similar al del virus parental C-S8c1. Este resultado demuestra que la introducción del cambio VP1 N17D estabiliza las cápsidas altamente lábiles de los mutantes VP3 A116V y VP3 A118V, lo que confirma que el residuo N17D de VP1 es un determinante de resistencia a pH ácido de la cápsida de VFA.

Como se ha comentado anteriormente (apartado 2.2.6.1.1), el modelo aceptado para la desencapsidación de VFA asume que la acidificación de los endosomas es el factor desencadenante del proceso. Existen numerosas evidencias experimentales que apoyan este modelo: predicciones *in silico* (van Vlijmen *et al.*, 1998), colocalizaciones de las partículas virales con marcadores de endosomas (Berryman *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2016; O'Donnell *et al.*, 2005), el hecho de que el tratamiento *in vitro* de partículas de VFA con pH ácido provoque la disociación de las mismas en subunidades pentaméricas (Brown, 1972; Newman *et al.*, 1973), las evidencias de que la infección de VFA es bloqueada por compuestos que inhiben la acidificación endosomal (Baxt, 1987; Carrillo *et al.*, 1985; Carrillo *et al.*, 1984), así como la correlación encontrada entre valores de pH de desencapsidación (pH₅₀) y sensibilidad a agentes inhibidores de la acidificación endosomal como el NH₄Cl (Biswal *et al.*, 2016; Martín-Acebes *et al.*, 2010; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Vázquez-Calvo,

2012). En este contexto, el análisis de las mutaciones que se seleccionan en variantes de VFA capaces de crecer en presencia de inhibidores de la acidificación endosomal (NH_4Cl) puede proporcionar información útil para entender la bases moleculares que regulan la estabilidad de la cápsida de VFA (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). Esta estrategia ha sido empleada en esta Tesis Doctoral. Para ello, diferentes variantes de VFA fueron crecidos en presencia de NH_4Cl . Tras los pases seriados se analizó la secuencia consenso de cada una de las poblaciones resultantes. Estas poblaciones presentaron diferentes mutaciones que se distribuyeron en dos regiones: la interfaz interpentamérica (VP2 G193C, VP3 D115E, A116T y A118V) y el N-terminal de VP1 (VP1 V11I, T12I T12A, D17G, Y18H y T22N). Todos los reemplazamientos localizados en la zona interpentamérica introducen una cadena lateral más voluminosa que, como se había propuesto previamente para los mutantes con resistencia incrementada a NH_4Cl VP3 A116V, VP3 A118V y A123T, puede estar desestabilizando las interacciones entre pentámeros adyacentes (Vázquez-Calvo, 2012; Martín-Acebes *et al.*, 2010). Estas interacciones son de crucial importancia para la estabilidad de la cápsida de VFA (Mateo *et al.*, 2003; Porta *et al.*, 2013).

Cuando el mutante VP1 N17D se creció presencia de NH_4Cl se seleccionaron las sustituciones VP3 A116T y A118V, generándose el triple mutante VP3 A116T + A118V VP1 N17D. Este virus merece especial atención por diversas razones: i) Presenta sustituciones localizadas en residuos previamente implicados en la estabilidad de la cápsida: VP3 A116 y VP3 A118. Con respecto a la primera de ellas, la presencia de un residuo de Val en la posición VP3 116 ha sido documentada en un mutante con la cápsida más lábil a pH ácido aislado a partir fluido vesicular de un animal infectado (Vázquez-Calvo, 2012). Sin embargo, en este nuevo triple mutante, esta posición se halla ocupada por un residuo de Thr. Tanto VP3 A116T como VP3 A118V suponen la introducción de un residuo con una cadena lateral más voluminosa que la de la Ala original, lo que podría debilitar las interacciones entre los pentámeros adyacentes, reduciendo así la estabilidad de la cápsida. Asimismo, la sustitución VP3 A118V había sido encontrada en otro mutante con una cápsida más lábil previamente aislado en el laboratorio en respuesta al tratamiento con NH_4Cl (Martín-Acebes *et al.*, 2010). ii) Este triple mutante combina sustituciones de aminoácido en la interfaz interpentamérica (VP3 A116T+A118V) y en el N-terminal de VP1 (VP1 N17D), lo que reproduce de forma espontánea el diseño racional de los dobles mutantes VP3 A116V VP1 N17D y VP3 A118V VP1 N17D. iii) Este virus contiene dos determinantes de labilidad (A116T y A118V): uno de ellos permitiría compensar el efecto estabilizador del cambio VP1 N17D (así como ocurría con los dobles mutantes VP3 A116V/VP3 A118V VP1 N17D) y el otro conferiría un *plus* de labilidad a la cápsida, facilitando así el escape del efecto inhibitorio del NH_4Cl .

DISCUSIÓN

En conjunto, estos resultados sugieren un efecto aditivo de las sustituciones de aminoácido en la estabilidad de la cápsida frente a pH ácido, y confirman la conexión funcional entre la región interpentamérica y el N-terminal de VP1 para regular la estabilidad del virus a pH ácido. Además de la sustitución VP1 N17D (apartado 2.2.6.1.2), se habían descrito previamente sustituciones de aminoácido en el extremo N-terminal de VP1 que aumentan la estabilidad de la cápsida de VFA frente a pH ácido (Twomey *et al.*, 1995). Sin embargo, hasta la fecha no se habían encontrado sustituciones en esta región que incrementasen su labilidad. En esta Tesis Doctoral se han descrito por primera vez este tipo de sustituciones en cinco posiciones en el extremo N-terminal de VP1 (V11, T12, Y18 y T22 en VFA de tipo C; T12 y T2 en VFA de tipo O), dos de ellas (T2 y V11) localizadas en posiciones altamente conservadas en todos los serotipos de VFA (Carrillo *et al.*, 2005). Además, hemos encontrado una pseudoreversión, VP1 D17G, seleccionada tras los pases del mutante VP1 N17D en presencia de NH₄Cl. Cabe destacar que el residuo T12 se ha encontrado sustituido por tres aminoácidos diferentes (Ala e Ile en los mutantes de VFA de tipo C, y Asn en un mutante de VFA de tipo O), lo que indica la plasticidad de esta posición. Por otro lado, la sustitución VP3 T156A, encontrada en dos mutantes lábiles a pH ácido de VFA de tipo O, se localiza muy cerca del extremo N-terminal de VP1. Según la base de datos ViperDb, este residuo interacciona con VP1 V11 y T13, localizados en esta región, sugiriendo que el reemplazamiento VP3 T156A podría estar afectando la funcionalidad del extremo N-terminal de VP1. De esta manera, los resultados obtenidos con VFA de tipo O corroboran los obtenidos con el VFA de tipo C, sugiriendo que la estabilidad de la cápsida está regulada por mecanismos comunes en ambos serotipos.

Según el modelo actual, la desencapsidación de VFA estaría relacionada con la protonación a pH ácido de dos residuos de His localizados en VP3 (H140 y H143 en el serotipo C) (apartado 2.2.6.1.1). Se permite especular que las mutaciones en el N-terminal de VP1 descritas en esta Tesis Doctoral alteran el pH de desencapsidación interfiriendo en este mecanismo. El cambio VP1 N17D es de tipo isostérico e introduce un aminoácido cargado positivamente que podría neutralizar parcialmente la H143 protonada, provocando por una mayor estabilidad de la cápsida frente a pH ácido (Liang *et al.*, 2014; Martín-Acebes *et al.*, 2011b). El mutante pseudorevertiente D17G apoya la hipótesis de la importancia de la carga en esta posición, ya que restaura la naturaleza neutra de este residuo, haciendo el virus más lábil en comparación con el parental N17D. Por otro lado, el reemplazamiento Y18H, encontrado en un mutante lábil a pH ácido, introduce un residuo protonable que podría generar un aumento de la carga positiva a pH ácido de la región N-terminal de VP1, generando así un efecto opuesto al provocado por la mutación N17D. Sin embargo, en los restantes mutantes

seleccionados no se observaron alteraciones en el balance total de cargas del extremo N-terminal de VP1, ni tampoco se observó un patrón común en los tipos de reemplazamientos encontrados, ya que mientras que las sustituciones T2A y T12A suponen la pérdida de las cadenas laterales, V11I, T12I, T12N y T22N introducen residuos con cadenas laterales más voluminosas. También hay que tener en cuenta que todas estas mutaciones afectan a residuos que interaccionan con diferentes aminoácidos de VP4, VP2 y VP3, y que, por lo tanto, estos reemplazamientos podrían estar alterando o eliminando algunas de estas interacciones. Por ejemplo, para los residuos VP1 T2, T12, V11 y N17 se predicen interacciones con una zona específica de VP4 comprendida entre los residuos 75-79. De esta manera, puesto que VFA se disocia en subunidades pentaméricas liberando el RNA y VP4, las sustituciones encontradas podrían afectar a este proceso, modificando de esta forma la labilidad a pH ácido de la cápsida. De hecho, la proteína VP4 se ha implicado en la desencapsidación de diferentes picornavirus (Fuchs y Blaas, 2010; Tosteson y Chow, 1997).

El extremo N-terminal de VP1 es una región importante para la desencapsidación de los picornavirus. En enterovirus y en rinovirus, esta región es altamente hidrofóbica y tras la unión con el receptor (poliovirus) o el calentamiento *in vitro* (poliovirus y rinovirus) aparece externalizada e insertada en la membrana (Tuthill *et al.*, 2010). Se ha descrito que péptidos con la secuencia del N-terminal de VP1 de rinovirus humano 2 permeabilizan endosomas (Prchla *et al.*, 1995). Además, las partículas 135 S de poliovirus, a pesar de haber perdido VP4, mantienen la capacidad de inducir la formación de poros en las membranas (Tosteson y Chow, 1997), apoyando la implicación de VP1 en este proceso (Tuthill *et al.*, 2010). La proteína VP1 de los aftovirus está truncada con respecto a la de poliovirus y no posee esta región hidrofóbica (Tuthill *et al.*, 2009). No obstante en VREA, un aftovirus estrechamente relacionado con VFA (apartado 2.3), se producen profundos cambios estructurales en el extremo N-terminal de VP1 tras ser expuesto a pH ácido (Tuthill *et al.*, 2009). Cabe remarcar que, para VFA, no se ha documentado todavía la existencia de intermedios de desencapsidación similares a los de VREA y que, según los datos actuales disponibles, la cápsida de VFA se disocia directamente en subunidades pentaméricas. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que el extremo N-terminal de VP1 juega un papel importante en la desencapsidación de VFA, como ocurre con otros picornavirus (enterovirus, rinovirus y VREA). Esto podría sugerir la existencia de requerimientos comunes para la desencapsidación de todos los picornavirus que evolutivamente habría ido especializándose en cada uno de los géneros (Tuthill *et al.*, 2009).

En resumen, dos regiones de la cápsida de VFA, la interpentamérica y el extremo N-terminal de VP1, a pesar de ser relativamente distantes entre ellas, están funcionalmente relacionadas para controlar

DISCUSIÓN

la estabilidad de la cápsida frente a pH ácido. Estos resultados sugieren, a su vez, que la estabilidad de la cápsida de VFA es un carácter multifactorial, resultado de una interacción compleja entre las diferentes proteínas de la cápsida.

6.1.2 Resistencia a NH₄Cl del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D

El NH₄Cl se comporta como una base débil y en su forma no protonada difunde fácilmente a través de las membranas, mientras que en compartimientos ácidos se protona y acumula aumentando el pH de los mismos (Marsh y Helenius, 1989). Esta propiedad de alcalinizar los compartimientos endosomales permite su empleo para el aislamiento de diferentes mutantes de VFA resistentes a NH₄Cl (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). Como se ha comentado en el apartado anterior, en esta Tesis Doctoral se ha obtenido una nueva batería de mutantes de VFA seleccionados tras pases seriados en presencia de NH₄Cl a partir de distintas variantes virales (apartado 5.1.2). En todos estos mutantes, el incremento en la capacidad de crecimiento en presencia de este compuesto se correspondió con un incremento en la sensibilidad a pH ácido de la cápsida, es decir, con un pH₅₀ mayor, lo que explicaría el mecanismo de escape del efecto inhibitorio del NH₄Cl (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012). En contraposición, los mutantes con cápsidas más resistentes a pH ácido como el mutante m6 (que lleva la mutación VP1 N17D) y el mutante VP3 H142D, construido de forma racional sustituyendo una de las His que actúan como sensor de pH por un residuo cargado negativamente (Asp), muestran una mayor sensibilidad a la inhibición de la acidificación endosomal con NH₄Cl o Con A (Biswal *et al.*, 2016; Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Asimismo, el mutante sr1 (VP2 H145Y VP1 N17D) (apartado 5.3), es más resistente a pH ácido que el mutante m6 (VP1 N17D) (apartado 5.3.4 y 5.3.5), y también más sensible a NH₄Cl y Con A (apartado 5.3.2). Estos resultados apoyan la existencia de una relación directa entre acidificación endosomal y el mecanismo de penetración de VFA para dar lugar a una infección productiva.

En cuanto al doble mutante VP3 A116V VP1 N17D, este virus combina una mutación que aumenta la labilidad de VFA (VP3 A116V) y otra que incrementa su estabilidad (VP1 N17D). El resultado de esta combinación es un virus con un fenotipo de resistencia a pH ácido intermedio entre los dos mutantes simples, con un pH₅₀ casi idéntico al virus parental C-S8c1. Sin embargo, cuando se analizó el crecimiento de este virus en presencia de NH₄Cl, se observó que éste escapaba, en cierta medida, a los efectos inhibitorios de la droga, mostrando un fenotipo intermedio entre C-S8c1 y el mutante VP3 A116V. Este resultado hacía interesante entender las razones de este comportamiento. Primeramente, se analizó el efecto del tratamiento con NH₄Cl sobre el doble mutante (VP3 A116V

VP1 N17D) y los virus de los cuales derivaba (VP3 A116V, VP1 N17D y C-S8c1), observándose que las poblaciones del doble mutante habían incrementado su pH de desencapsidación con respecto a las amplificadas en ausencia de NH_4Cl . Esto indicaba que un único pase en presencia de NH_4Cl es suficiente para alterar la sensibilidad a pH ácido del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D. Sin embargo, esto no ocurría con el virus parental C-S8c1, ni con los mutantes simples VP3 A116V y VP1 N17D, cuyos perfiles de inactivación por pH ácido fueron idénticos entre las muestras crecidas o no con NH_4Cl . Estos resultados sugieren una capacidad mayor del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D para adaptarse a la presión selectiva inducida por el NH_4Cl . Sin embargo, la secuenciación de las poblaciones virales sometidas a un único pase en presencia de NH_4Cl , no reveló la imposición de ningún cambio en la secuencia consenso del doble mutante correspondiente a las proteínas de la cápsida viral. Asumiendo que los cambios que afectan a la sensibilidad a NH_4Cl deben localizarse en la cápsida del virus, una posible explicación al fenotipo de resistencia a NH_4Cl de estas poblaciones es la presencia de múltiples mutaciones, distribuidas en diferentes posiciones de la cápsida, cada una con una frecuencia baja que no permita su detección en la secuencia consenso. Cabe destacar que en estos experimentos, el tiempo en el que los virus estuvieron creciendo en presencia de NH_4Cl fue corto (9 h), lo que podría explicar que no hubiese tiempo suficiente para la imposición en la secuencia consenso de la población de la/s secuencia/s correspondientes a los virus con mayor resistencia a NH_4Cl . De hecho, todas las variantes virales utilizadas en estos experimentos acabaron seleccionando mutaciones que les permiten crecer en presencia de NH_4Cl cuando fueron pasadas entre 10 o 20 veces en presencia de compuesto (apartado 5.1.2). Con el objetivo de analizar si el comportamiento del doble mutante era el resultado de la selección de variantes virales poco representadas en la población inicial, se evaluó el efecto de una bajada de la m.d.i. de hasta 1 000 veces sobre la resistencia a NH_4Cl del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D y del virus parental C-S8c1. El fundamento de este tipo de análisis se basa en que si la resistencia al fármaco se debe a mutantes preexistentes en baja proporción en la cuasiespecie viral, al reducir el número de virus que se utiliza en el ensayo, bajando la m.d.i. inicial, se debería reducir o eliminar el fenotipo de resistencia de esa población, ya que estos mutantes quedarían fuera de la población empleada para iniciar la infección (Sheldon *et al.*, 2014). Para llevar a cabo este experimento se usó virus recuperado directamente de sobrenadantes de transfección, para limitar la complejidad inicial de su cuasiespecie. El doble mutante fue más resistente a NH_4Cl que el virus parental a todas las m.d.i. empleadas, lo que puede ser interpretado de dos diferentes maneras. La primera es que en la población de los dos virus (C-S8c1 y doble mutante) existen desde el principio, a pesar de haber restringido la cuasiespecie con el

DISCUSIÓN

uso de sobrenadantes de transfección, variantes resistentes a NH_4Cl . De esta forma, el grado de resistencia a este compuesto dependería de la m.d.i. empleada. El hecho de que el mutante sea más resistentes a todas las m.d.i., podría indicar que estas variantes están más frecuentemente representadas en la población del doble mutante que en la del virus parental. La segunda forma de interpretar estos resultados implica que el doble mutante es capaz de responder más rápidamente que C-S8c1 al tratamiento con NH_4Cl , seleccionando mutaciones de resistencia a este compuesto. Cuando se realizaron ensayos de infección en medio semisólido con estos sobrenadantes, en presencia y en ausencia de NH_4Cl , el porcentaje de virus que fue capaz de crecer y desarrollar placas de lisis en presencia de NH_4Cl en el medio semisólido fue significativamente mayor para el doble mutante, sugiriendo, también en este caso, dos posibles interpretaciones: i) Los mutantes resistentes a NH_4Cl se hallaban en la población inicial (antes de la presión selectiva) y estaban mayormente representados en la población del doble mutante; ii) Aunque esta interpretación parece, a priori, menos probable, los mutantes resistentes a NH_4Cl se podrían haber generado durante la formación de la placa, siendo este proceso más rápido o efectivo para el doble mutante. Con el objetivo de estudiar el comportamiento del doble mutante con otras drogas, analizamos su resistencia a GuHCl , cuya diana es la polimerasa viral (Perales *et al.*, 2009), por lo que no actúa a nivel de las etapas tempranas de la infección como el NH_4Cl (Marsh y Helenius, 1989). En estos experimentos, se observó que el doble mutante VP3 A116V VP1 N17D presentaba una sensibilidad a GuHCl similar a la del virus parental C-S8c1. Además, el porcentaje de placas de lisis resistentes a este compuesto fue similar en los dos casos. Estos resultados sugirieron que la resistencia del doble mutante es específica para inhibidores de la acidificación endosomal, como el NH_4Cl , relacionándose por lo tanto con las etapas tempranas de la infección (desencapsidación y penetración del genoma en el citoplasma), más que con etapas tardías (replicación y traducción del genoma viral). Por otro lado, cuando se realizaron ensayos de competición entre el virus parental C-S8c1 y el doble mutante, este se impuso de forma clara, desplazando el virus C-S8c1 incluso en ausencia de NH_4Cl , lo que sugiere que el doble mutante posee mayor *fitness* que el virus parental, aunque no se apreciaron diferencias en las cinéticas de ambos virus. Además, de forma coherente con su resistencia a NH_4Cl , se observó que en presencia de la droga, el doble mutante era capaz de imponerse al virus parental ya en el pase 2. Esta imposición se asocia con la selección de la mutación VP1 T22N que confiere resistencia total a NH_4Cl , en el contexto genético del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D, y que se fue dominante en los pases 2 (Exp.3), 4 (Exp.2) y 6 (Exp.1), probablemente acompañada de otras mutaciones minoritarias (no detectables en la secuencia consenso) en los pases anteriores. Datos preliminares de secuenciación

masiva realizada sobre poblaciones del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D y del virus parental C-S8c1 pasadas en presencia y en ausencia de NH₄Cl, correspondiente a la zona interpentamérica y al N-terminal de VP1, indican que hay una frecuencia de polimorfismos 2 veces mayor en las poblaciones del doble mutante con respecto a las de C-S8c1, tanto en ausencia como en presencia de la presión selectiva del NH₄Cl. De esta manera, nuestra hipótesis actual para explicar el comportamiento diferencial del doble mutante VP3 A116V VP1 N17D contempla que la presencia de estas dos sustituciones confiere a la cápsida mayor tolerancia a otras sustituciones, lo que incrementa su plasticidad. De acuerdo con este modelo, la cápsida del doble mutante VP3 A116V VP1N17D podría disponer de un mayor repertorio de cambios viables y así adaptarse con mayor rapidez a presiones selectivas como la ejercida por el NH₄Cl. Aunque atractiva, esta hipótesis necesita ser validada analizando otros fenotipos asociados a la estructura de la cápsida viral como, por ejemplo, la resistencia a anticuerpos monoclonales.

6.1.3 La mutación VP2 H145Y incrementa la resistencia a pH ácido del mutante m6

Como se ha comentado en el apartado 6.1.1, la sustitución VP1 N17D (mutante m6) aumenta la estabilidad de la cápsida de diferentes serotipos de VFA, tanto a pH ácido como a temperatura (Liang *et al.*, 2014; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Wang *et al.*, 2014). Siguiendo esta línea conceptual, nos planteamos analizar si era posible encontrar mutantes de VFA con una resistencia a pH ácido mayor que la del mutante m6. Estos experimentos condujeron al aislamiento del mutante sr1 a partir de la población viral m6. Este mutante sr1 presenta dos sustituciones en la cápsida: la VP1 N17D, proveniente del virus m6, y VP2 H145Y. Dada la implicación de la posición VP2 H145Y en el procesamiento del precursor de la cápsida VP0 en picornavirus (apartado 2.2.6.2 y 5.3.7), se analizaron las proteínas estructurales contenidas en los viriones de este mutante, observándose que el procesamiento de VP0 ocurría de forma normal. Este resultado sugiere que el tipo de remplazamiento (His por Tyr) presente en el virus m6 no afecta al papel de esta posición en el corte del precursor VP0 y por esta razón es compatible con la infectividad del virus. Es más, cuando se introduce en el contexto de la sustitución VP1 N17D, la sustitución H145Y genera un virus muy estable a pH ácido (pH₅₀ 5.4 frente a 6.75 del virus parental C-S8c1). La razón de este fenotipo no es clara aunque se pueden formular algunas hipótesis, teniendo en cuenta la localización del residuo implicado, los aminoácidos con los que podría interactuar y el tipo de remplazamiento. Dado que el residuo VP2 H145 se localiza en la interfaz intraprotomérica, muy cerca de la sustitución F34L (apartado 5.3.3), se puede proponer que remplazamientos en esta zona afectan a la conformación del protómero, influyendo por lo tanto en el ensamblaje del pentámero y la estabilidad de la cápsida.

DISCUSIÓN

Por otro lado, VP2 H145 establece un puente de hidrógeno con VP2 T33 y se encuentra cerca de los residuos 6-9 del extremo N-terminal de VP1, una región en la que a menudo se localizan sustituciones que alteran la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VFA (ver apartado 6.1.1). Hay que considerar también que el residuo sustituido en este mutante es una His, aminoácido que puede protonarse cargándose positivamente cuando el pH de su entorno es inferior a su pKa, generando repulsiones electrostáticas que pueden contribuir a la desencapsidación del virus, de la misma manera que ocurre con los residuos de His localizados junto al borde del pentámero (apartado 2.2.6.1.1). El remplazamiento de esta His por Tyr, no protonable, podría estar bloqueando este mecanismo. Sin embargo, el pKa de la cadena lateral de VP2 H145, calculado con PROPKA es 5.25, compatible con una protonación a pH más bajos que el del interior de los endosomas tempranos (>6.1), que son los lugares en los que debería normalmente ocurrir el desensamblaje de la cápsida de VFA (apartado 2.2.6.1.1).

Recientemente, se ha descrito que las mutaciones VP2 H145Y y VP1 N17D incrementan la resistencia a pH ácido de VFA de serotipo Asia 1 (Wang *et al.*, 2014). En este trabajo, los mutantes simples VP2 H145Y o VP1 N17D fueron igual de resistentes a pH ácido que el doble mutante. Nuestros resultados con VFA de tipo C, sin embargo, muestran un efecto aditivo de las dos mutaciones VP2 H145Y y VP1 N17D en la resistencia del doble mutante, lo que podría indicar que las bases moleculares que gobiernan la estabilidad de la cápsida de VFA tienen puntos comunes entre los diferentes serotipos, aunque también difieren en algunos aspectos.

6.2 Potencial del virus sr1 como alternativa vacunal

6.2.1 Estabilidad térmica y *fitness* de los mutante m6 y sr1

En la actualidad, las vacunas inactivadas son una herramienta básica para prevenir y controlar la infección por VFA (Doel, 2003; Rodriguez y Grubman, 2009). La integridad estructural del virión (partícula 146 S) es uno de los factores más importantes que definen la eficacia de una preparación vacunal y que permiten la inducción de niveles óptimos de anticuerpos neutralizantes (Cartwright *et al.*, 1980; Cartwright *et al.*, 1982; Rao *et al.*, 1994). Por lo tanto, la inestabilidad a temperatura ambiente e incluso a 4 °C representa una limitación importante de este tipo de vacunas (apartado 2.2.5.1). Se ha descrito que la sustitución N17D en VP1, además de conferir estabilidad a pH ácido (apartado 2.2.6.1.2), incrementa la resistencia de VFA de tipo C a la inactivación térmica (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). Con el objetivo de analizar la resistencia de los mutante m6 (VP1 N17D) y sr1 (VP1 N17D VP2 H145Y) a la temperatura de almacenamiento de una vacuna comercial, se

almacenaron preparaciones purificadas del virus parental C-S8c1 y de estos dos mutantes durante 15 semanas a 4°C., observándose que los dos mutantes (m6 y sr1) conservaban un mayor porcentaje de viriones con respecto al virus parental, lo que confirma que la mutación VP1 N17D incrementa la estabilidad frente a temperatura del virión. En este ensayo no se observaron diferencias en la estabilidad térmica entre los mutantes m6 y sr1; es posible que el análisis a tiempos de incubación más largos hubiera permitido detectar diferencias de estabilidad entre los dos mutantes, aunque no deja de ser una especulación. Sin embargo, dado que el mutante sr1 es significativamente más estable a pH ácido que el mutante m6, se decidió comparar su antigenicidad e inmunogenicidad con la del virus parental C-S8c1.

Los primeros intentos llevados a cabo en los años 60 del pasado siglo para seleccionar variantes termoestables en poblaciones de VFA no dieron lugar a resultados satisfactorios, ya que las poblaciones obtenidas no pudieron asociarse a un cambio de genotipo y no eran genéticamente estables (Bachrach *et al.*, 1960; Pringle, 1964). De hecho, se ha propuesto que la mayoría de las mutaciones con potencial para incrementar la estabilidad de la cápsida tienen un efecto negativo en la *fitness* del virus, y por esto estarían muy poco representadas o incluso ausentes en la cuasiespecies de VFA (Bachrach *et al.*, 1960; Mateo *et al.*, 2007; Pringle, 1964). En nuestro caso, los mutantes m6 y sr1 fueron seleccionados sometiendo las poblaciones virales a presión selectiva con pH ácido, no con temperatura, y su proporción en la población total fue también muy baja. En concreto, el mutante sr1 se seleccionó a partir de la población m6 con una frecuencia de 10^{-6} y m6, a su vez, estaba representado con una frecuencia de 10^{-5} en la población de C-S8c1 (Martín-Acebes *et al.*, 2011b). La inestabilidad a pH ácido de la partícula de VFA juega un papel fundamental en la infección debido al mecanismo de desencapsidación basado en pH ácido (Mateu, 2017), lo que puede explicar que mutantes más estables estén poco representados en las poblaciones de VFA, ya, que, presumiblemente tendrían dificultades para desencapsidar y dar lugar a una infección productiva. Sin embargo, por el momento no existe una explicación biológica para la elevada inestabilidad térmica de los viriones de VFA, aunque se ha propuesto que esta inestabilidad podría ser necesaria para el establecimiento de infecciones persistentes en animales *carrier*, facilitando la diseminación y supervivencia de este patógeno en el campo (Hegde *et al.*, 2009; Rincón *et al.*, 2014). Las cápsidas de los mutantes sr1 y m6 representan ejemplos en los que la estabilidad a pH ácido se relaciona con estabilidad a temperatura, como ocurre con algunos mutantes construidos siguiendo un diseño racional (Kotecha *et al.*, 2015; Porta *et al.*, 2013). Sin embargo, la estabilidad a pH ácido y la estabilidad térmica de la cápsida de VFA no tienen por qué estar necesariamente relacionadas

DISCUSIÓN

(Mateu, 2016). De hecho, se ha descrito que las cápsidas vacías de VFA pueden ser más resistentes a pH ácido que el virión entero, aunque son menos resistentes a temperatura (Curry *et al.*, 1995; Doel y Baccarini, 1981). Por otro lado, diferentes serotipos de VFA con distinta sensibilidad a pH ácido muestran la misma sensibilidad a la inactivación térmica (Maree *et al.*, 2013). Además, también se ha descrito un mutante de VFA (VP2 A65H) resistente a la disociación en pentámeros inducida por calor pero no a la inducida por pH ácido (Rincón *et al.*, 2014).

Aunque a priori podría pensarse que un incremento en la estabilidad viral de la partícula frente a pH ácido debería implicar una reducción drástica del *fitness* del mutante, ya que la desencapsidación se vería dificultada, los mutantes sr1 y m6 presentaron cinéticas de crecimiento muy similares a la del virus parental y fueron genéticamente estables tras 6 pases seriados consecutivos. Esto indicaría que la reducción en el *fitness* que introducen estas mutaciones no es muy marcada. Es más, se ha descrito que el mutante sr1 en el contexto genómico de VFA de tipo Asia 1, es capaz de imponerse al virus parental en ensayos de competición sin presión selectiva de pH ácido, lo que incluso implicaría un aumento de *fitness* a pesar de mostrar un fenotipo de placa pequeña (Wang *et al.*, 2014). Pensando en la posible producción de vacunas inactivadas más estables a pH y temperatura basadas en estos mutantes, m6 y sr1, el hecho de que sean genéticamente estables y muestren cinéticas de crecimiento similares a las del virus parental puede ser de crucial importancia para permitir la amplificación a gran escala de estos virus.

6.2.2 Interacción del mutante sr1 con células dendríticas plasmacitoides

En el curso de esta Tesis Doctoral y como parte de una estancia llevada a cabo en el IVI (*Institute of Virology and Immunology*, Berna, Suiza), bajo supervisión del Dr. Artur Summerfield, se ha analizado la interacción del virus C-S8c1 y del mutante sr1 con pCD. Los resultados muestran que sr1 es capaz de estimular la producción de IFN- α en pCD a un nivel significativamente mayor que C-S8c1. La producción de INF de tipo I durante la replicación de los picornavirus se activa porque los intermediarios replicativos de doble cadena de RNA (dsRNA) generados durante la infección son reconocidos por sensores virales citoplásmicos (Feng *et al.*, 2012). Por lo tanto, a continuación analizamos la infección con los virus C-S8c1 y sr1 de una población enriquecida en pCD (CD172+), mediante el estudio de la expresión de las proteínas virales VP1 y 3A. Se encontraron niveles más altos de ambos antígenos en las células infectadas con el virus mutante que en las infectadas con C-S8c1. En particular, la proteína no estructural 3A, implicada en la replicación del virus (O'Donnell *et al.*, 2001), no se pudo detectar en las células infectadas con C-S8c1, sugiriendo ausencia de

replicación o niveles muy bajos de la misma. Este resultado es consistente con que la mayor producción de IFN- α por las pCD tras la infección con el virus sr1 se deba a su mayor capacidad replicativa en este tipo celular. Por otro lado, a la hora de analizar estos resultados hay que tener en cuenta que las pCD porcinas reconocen ssRNA viral a través de moléculas de TLR7 localizadas en la membrana endosomal (Diebold *et al.*, 2004) y que este mecanismo ocurre tras la infección con VFA (Lannes *et al.*, 2012). Dada su resistencia a pH ácido, no se puede excluir que el virus sr1 tenga una cinética de desencapsidación que favorezca una estimulación más efectiva o duradera de TLR7.

Las implicaciones de este resultado en el uso potencial de sr1 como vacuna inactivada no son obvias, ya que se ha descrito que la estimulación de las pCD por parte de VFA requiere que el virus empiece su ciclo replicativo, no pudiéndose observar con virus inactivado, como el usado en formulaciones vacunales (Guzylack-Piriou *et al.*, 2006).

6.2.3 Potencial inmunogénico de una vacuna inactivada basada en el mutante sr1

Tras comprobar que las mutaciones VP2 H145Y VP1 N17D en la cápsida de VFA no alteraban a la antigenicidad de la partícula viral (apartado 5.3.9.1), decidimos analizar el potencial inmunogénico del mutante sr1 como candidato vacunal y compararlo con el del virus parental C-S8c1. Para esto, se utilizaron viriones purificados inactivados con BEI de la misma manera que las vacunas comerciales, con los que se realizó un ensayo de vacunación en cerdo, un importante hospedador natural de VFA. En primer lugar, puesto que los anticuerpos neutralizantes juegan un papel fundamental en la protección frente a la infección de VFA, se analizó su presencia en los sueros de los animales vacunados (Doel, 2005). Según un estudio llevado a cabo con ganado vacunado y posteriormente desafiado con VFA, títulos de anticuerpos neutralizantes mayores de 1:18 se relacionan con una alta probabilidad de que los animales estén protegidos frente a la infección (McCullough *et al.*, 1993). A día 21 p.v. las medianas de los títulos neutralizantes fueron de 1:32, lo que es compatible con la protección de los animales. A pesar de una ligera tendencia a alcanzar títulos de anticuerpos neutralizantes menores en los animales inmunizados con el virus sr1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, indicando que las sustituciones VP1 N17D y VP2 H145Y no alteran de forma importante el potencial inmunogénico de los viriones. Esta conservación de la inmunogenicidad ha sido descrita para otra vacuna de VFA de tipo O y SAT-2 basada en cápsidas vacías con estabilidad térmica incrementada que incluían la mutación VP2 S93T (Kotecha *et al.*, 2015). Dado que la modulación del balance entre los diferentes isotipos de anticuerpos inducidos por las vacunas frente a FA podrían ser determinante para la eficacia de una vacuna (Mulcahy *et al.*, 1990), nos planteamos llevar a cabo un análisis exhaustivo de la respuesta humoral inducida en los animales

DISCUSIÓN

inmunizados. Los niveles de anticuerpos totales circulantes (Ig totales), examinados tras la primera (28 días) y la segunda (70 días) vacunación, siguieron el mismo patrón que los anticuerpos neutralizantes, sin observarse diferencias significativas entre los animales vacunados con el C-S8c1 o con el mutante sr1. La IgG constituye el 80% de las Ig totales (Junqueira, 2003) y en cerdos se han descrito 6 clases distintas de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5 y IgG6 (Butler *et al.*, 2009). Sin embargo, sólo existen anticuerpos específicos disponibles frente a IgG1 e IgG2 porcinos (Pacheco *et al.*, 2010), que fueron las incluidas en este análisis. IgG1 es la IgG que se produce de forma más abundante en cerdos jóvenes y adultos (Butler y Wertz, 2006), mientras que IgG2 es, en general, menos abundante (Butler *et al.*, 2009; Eguchi-Ogawa *et al.*, 2010). Se ha propuesto también que esta inmunoglobulina es la más relevante a la hora de conferir protección (Mulcahy *et al.*, 1990). En nuestro análisis, los títulos de IgG1 fueron muy similares a los de anticuerpos totales, confirmando que se trataba del tipo de inmunoglobulina más representada en el animal. Tras la primera inmunización se detectaron niveles más altos de IgG1 en ambos grupos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas, y estos niveles se incrementaron tras la administración de la segunda dosis de la vacuna. Los títulos de IgG2 fueron en general más bajos y no se detectaron hasta la administración de la segunda dosis de la vacuna. Por otro lado, se ha descrito que la detección de IgA frente a VFA en suero es indicadora de su presencia en las mucosas de los animales (Pacheco *et al.*, 2010), donde constituye la primera barrera contra la infección (Eble *et al.*, 2007). Tras la primera vacunación, no fue posible detectar títulos de IgA frente a VFA. Este resultado apoya el obtenido por otros autores según los cuales una sola administración intramuscular de una vacuna inactivada de VFA no induce títulos detectables de IgA (Pacheco *et al.*, 2010). Sin embargo, tras la segunda dosis de la vacuna se detectaron IgA específicas en el suero de los animales de ambos grupos, lo que sugiere la inducción de inmunidad humoral asociada a mucosas (Doel, 2005). En cuanto a las IgM, éstas son las primeras en aparecer tras la exposición al inmunógeno (Alberts, 2002) y contribuyen a la opsonización del mismo activando el complemento (Wellek *et al.*, 1976). Puesto que la concentración en la sangre de este tipo de Ig llega a un máximo y luego decae rápidamente, analizamos su concentración a tiempos anteriores a la administración de la segunda dosis de la vacuna (7, 14, 21, 28 días p.v.). Se observó que el pico máximo de IgM no apareció de forma homogénea en todos los animales, lo que dificultó la comparación entre ellos, aunque los niveles de IgM fueron en general más bajos para los animales inmunizados con el mutante sr1, observándose diferencias estadísticamente significativa a día 14. A pesar de estas diferencias en cuanto a la IgM, el resto de Ig analizadas, así como los niveles de anticuerpos neutralizantes inducidos apoyan que la inmunogenicidad de los viriones está preservada

en la vacuna inactivada basada en el mutante sr1. Teniendo en cuenta las ventajas en cuanto a estabilidad térmica y a pH ácido de la cápsida del mutante sr1, estos resultados justificarían la utilización del mutante sr1 como alternativa vacunal.

6.3 Análisis de mutantes de VREA con diferentes grados de sensibilidad a pH ácido

Como se ha comentado en la Introducción, el VREA es un modelo muy práctico para el análisis de la biología de los aftovirus, razón por la que nos planteamos investigar las bases moleculares que controlan su estabilidad a pH ácido. Con este objetivo, siguiendo la línea del trabajo realizado con VFA, se aislaron y caracterizaron mutantes de VREA con diferente grado de sensibilidad a pH ácido. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que el incremento en la resistencia a la inhibición producida por NH_4Cl es debida a un aumento del pH de desencapsidación (mutantes RC3, RC8, RC19) y que, por otro lado, una disminución del pH de desencapsidación implica un incremento en la sensibilidad a NH_4Cl (mutantes Res1 y Res2). Como ocurre con VFA (Biswal *et al.*, 2016; Martín-Acebes *et al.*, 2010; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Vázquez-Calvo, 2012) estos resultados apoyan la existencia de una relación entre la desencapsidación de VREA y el pH endosomal (Groppelli *et al.*, 2010). Los mutantes de VREA con sensibilidad alterada a pH ácido presentaron un tamaño de placa y una cinética de crecimiento similar al virus parental, sugiriendo que este tipo de mutantes puede obtenerse sin un elevado coste de *fitness*, de la misma manera de lo que se ha descrito en VFA (Biswal *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2014; Martín-Acebes *et al.*, 2010; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Vázquez-Calvo, 2012; Wang *et al.*, 2014). Por otro lado, no se puede excluir que estas sustituciones puedan ser deletéreas *in vivo*, como ocurre en VFA (Vázquez-Calvo, 2012). De hecho, es razonable suponer que evolutivamente VREA haya seleccionado un pH óptimo de desencapsidación y que el desplazamiento de este valor pueda suponer un cierto grado de atenuación *in vivo*.

Todos los remplazamientos encontrados en los mutantes de VREA se sitúan en la proteína VP3 y no siguen un patrón único. En los mutantes sensibles a pH ácido RC3 y RC19 un residuo hidrofóbico es sustituido por otro también hidrofóbico (F53Y e I109V), pero en un caso con una cadena lateral más voluminosa (F53Y) y en el otro caso con una cadena lateral más pequeña (I109V). En el mutante sensible a pH ácido RC8, en cambio, la pérdida de una carga positiva se asocia con la introducción de un residuo más pequeño (R203C). Curiosamente, la sustitución R203C elimina una carga positiva que interacciona con el residuo cargado negativamente VP2 E201, sugiriendo que el mecanismo de acción de este mutante puede residir en la pérdida de carga electrostática en esta región. En el caso de los virus resistentes a pH ácido Res1 y Res2, la sustitución seleccionada mantuvo un residuo polar, pero con una cadena lateral más pequeña (N105S). N105, I109 y R203 se localizan en una lámina β de la

DISCUSIÓN

cápsida (Tuthill *et al.*, 2009). En VFA, algunos residuos clave para la estabilidad de la cápsida a pH ácido (VP3 116, 118, 123) también se localizaban en una lámina β (Martín-Acebes *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo, 2012) aunque, en este caso, localizada cerca de la interfaz interpentamérica y no en la interfaz intraprotomérica entre VP3 y VP2, como ocurre en VREA. De esta manera, los mutantes de VREA VP3 F53Y, I109V y R203C sugieren por primera vez que la interfaz entre VP3 y VP2 en un mismo protómero constituye una región clave para la modulación de la estabilidad a pH ácido de la cápsida. A su vez, todos estos residuos se localizan también muy cerca del extremo N-terminal de VP1 en la partícula de VREA. La sustitución VP3 N105S se sitúa en la interfaz entre VP3 y VP1, y el remplazamiento VP3 I109V afecta también un aminoácido que interacciona con el extremo N-terminal de VP1 a pH neutro (VP1 G5). Ambas interacciones se pierden en las partículas vacías tras exposición a pH ácido.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral apoyan la hipótesis que el extremo N-terminal de VP1 es una región clave en la desencapsidación de los picornavirus (Lyu *et al.*, 2014; Pickl-Herk *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2013). De hecho, datos previos han descrito que en esta región en VREA tienen lugar importantes cambios conformacionales durante la transición del virión al intermedio de desencapsidación producido tras exposición a pH ácido (Tuthill *et al.*, 2009). Por otro lado, estos datos también apoyan la implicación del extremo N-terminal de VP1 en la modulación de la estabilidad a pH ácido de la cápsida de los aftovirus, documentada para VFA por otros autores (Liang *et al.*, 2014; Martín-Acebes *et al.*, 2011b; Wang *et al.*, 2014) y en esta Tesis Doctoral (apartado 5.1). Por otra parte, los resultados desvelan el papel de los residuos localizados en la interfaz intraprotomérica entre VP3 y VP2 en la modulación de la estabilidad a pH ácido de la cápsida de los aftovirus, modulación que en VFA se ha relacionado principalmente con residuos localizados en la interfaz interpentamérica o en el extremo N-terminal de VP1 (Biswal *et al.*, 2016; Ellard *et al.*, 1999; Maree *et al.*, 2013; Martín-Acebes *et al.*, 2010). En este contexto, cabe destacar que la sustitución VP2 H145Y, que confiere resistencia a pH ácido a C-S8c1 (apartado 5.3) y a VFA de serotipo Asia-1 (Park *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014), se localiza también en la interfaz entre VP3 y VP2. Además, este aminoácido interacciona con el extremo N-terminal de VP1, como ocurre con las posiciones mutadas de las variantes de VREA seleccionadas en este trabajo. Estos resultados podrían sugerir ciertos paralelismos en las regiones que gobiernan la estabilidad de la cápsida de VFA y VREA. Sin embargo, a diferencia de VFA, en que se encuentran sustituciones de aminoácido en diferentes proteínas, todos los remplazamientos encontrados en VREA se localizan en VP3, que es, por otra parte, la proteína estructural más conservada entre VREA y VFA (Tuthill *et al.*, 2009). De esta manera, las

diferentes regiones en las que se localizan los residuos que alteran la sensibilidad a pH ácido en VFA y VREA podrían reflejar diferencias en el mecanismo de desencapsidación de estos virus. De hecho, la salida del genoma viral desde el endosoma al citoplasma en VREA ocurre por medio de un intermedio de desencapsidación (Tuthill *et al.*, 2009). En VFA hay escasas evidencias de una estructura intermedia similar (Rowlands *et al.*, 1975) y el modelo actual de desencapsidación de VFA contempla su rápida disociación en subunidades pentaméricas (Baxt y Bachrach, 1980; Martín-Acebes *et al.*, 2010). El paralelismo entre los mutantes de VFA y VREA (la participación de VP3 y las conexiones con residuos del extremo N-terminal de VP1) es compatible con la hipótesis de un mecanismo ancestral común para la desencapsidación de los aftovirus (Tuthill *et al.*, 2009). En contraposición, las diferentes zonas en las que se localizan las mutaciones podrían indicar la especialización y diversificación de los mecanismos de desencapsidación de VFA y VREA, como producto de la evolución viral.

En conjunto, estos resultados sugieren que VP3, y en particular la región intraprotomérica de las interfaces entre VP3, VP2 y VP1, constituyen elementos reguladores clave en la estabilidad de la cápsida de VREA. Esta información amplía nuestro conocimiento sobre la estabilidad de la cápsida de los aftovirus y podría ser de utilidad en las estrategias de mejora de las vacunas existentes basadas en un incremento en la estabilidad de la cápsida.

7. Conclusiones

- 1.** Las sustituciones de aminoácido identificadas en los mutantes de VFA con diferente sensibilidad a pH ácido se distribuyen preferentemente en dos regiones diferentes de la cápsida: el extremo N-terminal de VP1 (VP1 T2A, VP1 Y18H, VP1 D17G, VP1 V11I, VP1 T12I/A/N, VP1 T22N) y la interfaz pentamérica (VP3 A116T, VP3 A118V, VP3 D115E). Estas regiones están funcionalmente relacionadas y contribuyen a la estabilidad de la partícula viral a pH ácido.
- 2.** El fenotipo de sensibilidad a pH ácido de la cápsida de VFA C-S8c1 debido a mutaciones localizadas en la interfaz pentamérica (VP3 A116V y VP3 A118V) puede ser compensado por la introducción de un cambio en el extremo N-terminal de VP1 (VP1 N17D), sugiriendo que estas regiones están funcionalmente relacionadas y contribuyen a la estabilidad de la partícula viral a pH ácido.
- 3.** La combinación de las sustituciones VP2 H145Y y VP1 N17D incrementa de forma aditiva la resistencia a pH ácido de la cápsida de VFA C-S8c1.
- 4.** La sustitución VP1 N17D, de forma independiente o combinada con VP2 H145Y incrementa la estabilidad a 4 °C de los viriones de VFA C-S8c1
- 5.** Una vacuna inactivada producida a partir de un mutante de VFA C-S8c1 con las sustituciones de aminoácido VP2 H145Y y VP1 N17D induce una respuesta humoral similar a la del virus parental.
- 6.** La proteína VP3, en concreto su interfaz con las proteínas VP2 y VP1, constituye un determinante clave de la estabilidad a pH ácido de la cápsida de VREA.

8. Bibliografía

- ACHARYA, R., FRY, E., STUART, D., FOX, G., ROWLANDS, D. y BROWN, F. 1989. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337, 709-16.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., WALTER, P., RAFF, M., ROBERTS, K., 2002. *En: ROOTLEDGE (ed.) Molecular Biology of the Cell.*
- ANDREEV, D. E., FERNANDEZ-MIRAGALL, O., RAMAJO, J., DMITRIEV, S. E., TERENIN, I. M., MARTINEZ-SALAS, E. y SHATSKY, I. N. 2007. Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA. *RNA*, 13, 1366-74.
- ANSARDI, D. C. y MORROW, C. D. 1995. Amino acid substitutions in the poliovirus maturation cleavage site affect assembly and result in accumulation of provirions. *J Virol*, 69, 1540-7.
- ARNOLD, E., LUO, M., VRIEND, G., ROSSMANN, M. G., PALMENBERG, A. C., PARKS, G. D., NICKLIN, M. J. y WIMMER, E. 1987. Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 21-5.
- BACHRACH, H. L. 1977. Properties, molecular biology and immunogenicity. *En: ROMBERGER, J. A. (ed.) Foot-and-mouth disease virus.* Allanheld: Osmon and Co. Montclair.
- BACHRACH, H. L., PATTY, R. E. y PLEDGER, R. A. 1960. Thermal-resistant populations of foot-and-mouth disease virus. *Proc Soc Exp Biol Med*, 103, 540-2.
- BACHRACH, H. L., TRAUTMAN, R. y BREESE, S. S., JR. 1964. Chemical Physical Properties of Virtually Pure Foot-and-Mouth Disease Virus. *Am J Vet Res*, 25, 333-42.
- 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 antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*, 8, 299-303.
- BAKKER, S. E., GROPELLI, E., PEARSON, A. R., STOCKLEY, P. G., ROWLANDS, D. J. y RANSON, N. A. 2014. Limits of structural plasticity in a picornavirus capsid revealed by a massively expanded equine rhinitis A virus particle. *J Virol*, 88, 6093-9.
- BARANOWSKI, E., RUIZ-JARABO, C. M., SEVILLA, N., ANDREU, D., BECK, E. y 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.
- BARTELING, S. J. y CASSIM, N. I. 2004. Very fast (and safe) inactivation of foot-and-mouth disease virus and enteroviruses by a combination of binary ethyleneimine and formaldehyde. *Dev Biol (Basel)*, 119, 449-55.
- BASAVAPPA, R., SYED, R., FLORE, O., ICENOGLU, J. P., FILMAN, D. J. y HOGLE, J. M. 1994. Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci*, 3, 1651-69.
- BAUTISTA, E. M., FERMAN, G. S., GREGG, D., BRUM, M. C., GRUBMAN, M. J. y GOLDE, W. T. 2005. Constitutive expression of alpha interferon by skin dendritic cells confers resistance to infection by foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 79, 4838-47.
- BAXT, B. 1987. Effect of lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. *Virus Res*, 7, 257-71.
- BAXT, B. y BACHRACH, H. L. 1980. Early interactions of foot-and-mouth disease virus with cultured cells. *Virology*, 104, 42-55.
- BAXT, B. y 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.
- BECK, E. y STROHMAIER, K. 1987. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J Virol*, 61, 1621-9.
- BELNAP, D. M., FILMAN, D. J., TRUS, B. L., CHENG, N., BOOY, F. P., CONWAY, J. F., CURRY, S., HIREMATH, C. N., TSANG, S. K., STEVEN, A. C. y HOGLE, J. M. 2000. Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J Virol*, 74, 1342-54.

BIBLIOGRAFÍA

- 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, 1105-10.
- BELSHAM, G. J. 1993. Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog Biophys Mol Biol*, 60, 241-60.
- 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.
- BERKA, U., KHAN, A., BLAAS, D. y FUCHS, R. 2009. Human rhinovirus type 2 uncoating at the plasma membrane is not affected by a pH gradient but is affected by the membrane potential. *J Virol*, 83, 3778-87.
- BERRYMAN, S., CLARK, S., MONAGHAN, P. y JACKSON, T. 2005. Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 79, 8519-34.
- BIENZ, K., EGGER, D. y 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, 220-6.
- BIGERIEGO, P., ROSAS, M. F., ZAMORA, E., MARTINEZ-SALAS, E. y SOBRINO, F. 1999. Heterotypic inhibition of foot-and-mouth disease virus infection by combinations of RNA transcripts corresponding to the 5' and 3' regions. *Antiviral Res*, 44, 133-41.
- BIRTLEY, J. R., KNOX, S. R., JAULENT, A. M., BRICK, P., LEATHERBARROW, R. J. y CURRY, S. 2005. Crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease. New insights into catalytic mechanism and cleavage specificity. *J Biol Chem*, 280, 11520-7.
- BISWAL, J. K., DAS, B., SHARMA, G. K., KHULAPE, S. A. y PATTNAIK, B. 2016. Role of a single amino acid substitution of VP3 H142D for increased acid resistance of foot-and-mouth disease virus serotype A. *Virus Genes*.
- BORREGO, B., NOVELLA, I. S., GIRALT, E., ANDREU, D. y DOMINGO, E. 1993. Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *J Virol*, 67, 6071-9.
- BORREGO, B., RODRIGUEZ-PULIDO, M., MATEOS, F., DE LA LOSA, N., SOBRINO, F. y SAIZ, M. 2013. Delivery of synthetic RNA can enhance the immunogenicity of vaccines against foot-and-mouth disease virus (FMDV) in mice. *Vaccine*, 31, 4375-81.
- BRABEC, M., SCHOBBER, D., WAGNER, E., BAYER, N., MURPHY, R. F., BLAAS, D. y FUCHS, R. 2005. Opening of size-selective pores in endosomes during human rhinovirus serotype 2 in vivo uncoating monitored by single-organelle flow analysis. *J Virol*, 79, 1008-16.
- BRITO, B. P., RODRIGUEZ, L. L., HAMMOND, J. M., PINTO, J. y PEREZ, A. M. 2015. Review of the Global Distribution of Foot-and-Mouth Disease Virus from 2007 to 2014. *Transbound Emerg Dis*.
- BROWN, F. 1972. Structure-function relationships in foot-and-mouth disease virus. *Adv Exp Med Biol*, 31, 19-28.
- BROWN, F. 2001. Inactivation of viruses by aziridines. *Vaccine*, 20, 322-7.
- BROWN, F. y CARTWRIGHT, B. 1961. Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components. *Nature*, 192, 1163-4.
- BROWN, F. y CRICK, J. 1959. Application of agar-gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease. *J Immunol*, 82, 444-7.
- BROWN, F., HYSLOP, N. S., CRICK, J. y MORROW, A. W. 1963. The Use of Acetyleneimine in the Production of Inactivated Foot-and-Mouth Disease Vaccines. *J Hyg (Lond)*, 61, 337-44.
- BUBECK, D., FILMAN, D. J., CHENG, N., STEVEN, A. C., HOGLE, J. M. y BELNAP, D. M. 2005. The structure of the poliovirus 135S cell entry intermediate at 10-angstrom resolution reveals the location of an externalized polypeptide that binds to membranes. *J Virol*, 79, 7745-55.
- BURROWS, R. 1969. Equine rhinoviruses. *2nd International Conference on Equine Infectious Diseases*.
- BUTAN, C., FILMAN, D. J. y HOGLE, J. M. 2014. Cryo-electron microscopy reconstruction shows poliovirus 135S particles poised for membrane interaction and RNA release. *J Virol*, 88, 1758-70.

- BUTLER, J. E. y WERTZ, N. 2006. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. XVII. IgG subclass transcription revisited with emphasis on new IgG3. *J Immunol*, 177, 5480-9.
- BUTLER, J. E., ZHAO, Y., SINKORA, M., WERTZ, N. y KACSKOVICS, I. 2009. Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Dev Comp Immunol*, 33, 321-33.
- CARMAN, S., ROSENDAL, S., HUBER, L., GYLES, C., MCKEE, S., WILLOUGHBY, R. A., DUBOVI, E., THORSEN, J. y LEIN, D. 1997. Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario. *J Vet Diagn Invest*, 9, 17-23.
- CARRILLO, C., PLANA, J., MASCARELLA, R., BERGADA, J. y SOBRINO, F. 1990. Genetic and phenotypic variability during replication of foot-and-mouth disease virus in swine. *Virology*, 179, 890-2.
- 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, 6487-504.
- CARRILLO, E. C., GIACHETTI, C. y CAMPOS, R. 1985. Early steps in FMDV replication: further analysis on the effects of chloroquine. *Virology*, 147, 118-25.
- 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.
- CARTWRIGHT, B., CHAPMAN, W. G. y BROWN, F. 1980. Serological and immunological relations between the 146S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 50, 369-75.
- CARTWRIGHT, B., MORRELL, D. J. y BROWN, F. 1982. Nature of the antibody response to the foot-and-mouth disease virus particle, its 12S protein subunit and the isolated immunizing polypeptide VP1. *J Gen Virol*, 63, 375-81.
- CUBILLOS, C., DE LA TORRE, B. G., JAKAB, A., CLEMENTI, G., BORRAS, E., BARCENA, J., ANDREU, D., SOBRINO, F. y 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, 7223-30.
- CURRY, S., ABRAMS, C. C., FRY, E., CROWTHER, J. C., BELSHAM, G. J., STUART, D. I. y KING, A. M. 1995. Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol*, 69, 430-8.
- 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. y 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, 9743-52.
- CHOW, M., NEWMAN, J. F., FILMAN, D., HOGLE, J. M., ROWLANDS, D. J. y BROWN, F. 1987. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327, 482-6.
- DANIELS, R. S., DOWNIE, J. C., HAY, A. J., KNOSSOW, M., SKEHEL, J. J., WANG, M. L. y WILEY, D. C. 1985. Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell*, 40, 431-9.
- DAVIS, M. P., BOTTLEY, G., BEALES, L. P., KILLINGTON, R. A., ROWLANDS, D. J. y TUTHILL, T. J. 2008. Recombinant VP4 of human rhinovirus induces permeability in model membranes. *J Virol*, 82, 4169-74.
- DE COLIBUS, L., WANG, X., SPYROU, J. A., KELLY, J., REN, J., GRIMES, J., PUERSTINGER, G., STONEHOUSE, N., WALTER, T. S., HU, Z., WANG, J., LI, X., PENG, W., ROWLANDS, D. J., FRY, E. E., RAO, Z. y STUART, D. I. 2014. More-powerful virus inhibitors from structure-based analysis of HEV71 capsid-binding molecules. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 282-8.
- DE DIEGO, M., BROCCHI, E., MACKAY, D. y DE SIMONE, F. 1997. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch Virol*, 142, 2021-33.
- DE LA HIGUERA, I. 2014. *Factores determinantes del reconocimiento de nucleótidos en el virus de la fiebre aftosa*. Universidad Autónoma de Madrid.
- DE LA TORRE, J. C., MARTINEZ-SALAS, E., DIEZ, J., VILLAVARDE, A., GEBAUER, F., ROCHA, E., DAVILA, M. y DOMINGO, E. 1988. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol*, 62, 2050-8.

BIBLIOGRAFÍA

- DE LOS SANTOS, T., DIAZ-SAN SEGUNDO, F. y GRUBMAN, M. J. 2007. Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J Virol*, 81, 12803-15.
- DEAN, R. T., JESSUP, W. y ROBERTS, C. R. 1984. Effects of exogenous amines on mammalian cells, with particular reference to membrane flow. *Biochem J*, 217, 27-40.
- DEVANEY, M. A., VAKHARIA, V. N., LLOYD, R. E., EHRENFELD, E. y GRUBMAN, M. J. 1988. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol*, 62, 4407-9.
- DIAZ-MENDEZ, A., HEWSON, J., SHEWEN, P., NAGY, E. y VIEL, L. 2014. Characteristics of respiratory tract disease in horses inoculated with equine rhinitis A virus. *Am J Vet Res*, 75, 169-78.
- DIEBOLD, S. S., KAISHO, T., HEMMI, H., AKIRA, S. y REIS E SOUSA, C. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303, 1529-31.
- DIEZ, J., MATEU, M. G. y DOMINGO, E. 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 (Pt 12), 3281-9.
- DITCHFIELD, J. y MACPHERSON, L. W. 1965. The Properties and Classification of Two New Rhinoviruses Recovered from Horses in Toronto, Canada. *Cornell Vet*, 55, 181-9.
- DOEDENS, J. R. y KIRKEGAARD, K. 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J*, 14, 894-907.
- DOEL, T. R. 1999. Optimisation of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 17, 1767-71.
- DOEL, T. R. 2003. FMD vaccines. *Virus Res*, 91, 81-99.
- DOEL, T. R. 2005. Natural and vaccine induced immunity to FMD. *Curr Top Microbiol Immunol*, 288, 103-31.
- DOEL, T. R. y BACCARINI, P. J. 1981. Thermal stability of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 70, 21-32.
- DOMINGO, E., BARANOWSKI, E., NUÑEZ, J.I., RUIZ-JARABO C.M., SIERRA, S., MOLINA, N. Y SOBRINO F. 2000. Cuasiespecies y evolución molecular de virus *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)*, 19, 55-63.
- DOMINGO, E., ESCARMIS, C., BARANOWSKI, E., RUIZ-JARABO, C. M., CARRILLO, E., NUNEZ, J. I. y SOBRINO, F. 2003. Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 91, 47-63.
- DOMINGO, E., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A, DOPAZO, G., MOYA, A., SOBRINO, F. 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. *En: KURSTAK, E., MARUSYK, R.G., MURPHY, F.A., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (ed.) Applied Virology Research*. New York: Plenum Press.
- DOMINGO, E., MENENDEZ-ARIAS, L. y HOLLAND, J. J. 1997. RNA virus fitness. *Rev Med Virol*, 7, 87-96.
- DOMS, R. W., HELENIUS, A. y WHITE, J. 1985. Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin. The low pH-induced conformational change. *J Biol Chem*, 260, 2973-81.
- DROSE, S. y ALTENDORF, K. 1997. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol*, 200, 1-8.
- EBLE, P. L., BOUMA, A., WEERDMEESTER, K., STEGEMAN, J. A. y DEKKER, A. 2007. Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine*, 25, 1043-54.
- EGUCHI-OGAWA, T., WERTZ, N., SUN, X. Z., PIUMI, F., UENISHI, H., WELLS, K., CHARDON, P., TOBIN, G. J. y BUTLER, J. E. 2010. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. XI. The relationship of variable heavy chain gene usage and the genomic organization of the variable heavy chain locus. *J Immunol*, 184, 3734-42.
- ELLARD, F. M., DREW, J., BLAKEMORE, W. E., STUART, D. I. y 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), 1911-8.
- ESCARMIS, C., DAVILA, M., CHARPENTIER, N., BRACHO, A., MOYA, A. y DOMINGO, E. 1996. Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol*, 264, 255-67.
- ESCARMIS, 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, 113-25.
- 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.

- FELDMAN, S. B., FERRARO, M., ZHENG, H. M., PATEL, N., GOULD-FOGERITE, S. y FITZGERALD-BOCARSLY, P. 1994. Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology*, 204, 1-7.
- FENG, Q., HATO, S. V., LANGEREIS, M. A., ZOLL, J., VIRGEN-SLANE, R., PEISLEY, A., HUR, S., SEMLER, B. L., VAN RIJ, R. P. y VAN KUPPEVELD, F. J. 2012. MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep*, 2, 1187-96.
- 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.
- FERNANDEZ-MIRAGALL, O., LOPEZ DE QUINTO, S. y MARTINEZ-SALAS, E. 2009. Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res*, 139, 172-82.
- FERNANDEZ-TOMAS, C. B. y BALTIMORE, D. 1973. Morphogenesis of poliovirus. II. Demonstration of a new intermediate, the proviron. *J Virol*, 12, 1122-30.
- FERRER-ORTA, C., SIERRA, M., AGUDO, R., DE LA HIGUERA, I., ARIAS, A., PEREZ-LUQUE, R., ESCARMIS, C., DOMINGO, E. y VERDAGUER, N. 2010. Structure of foot-and-mouth disease virus mutant polymerases with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol*, 84, 6188-99.
- FITZGERALD-BOCARSLY, P. 1993. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther*, 60, 39-62.
- FITZGERALD-BOCARSLY, P., DAI, J. y SINGH, S. 2008. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19, 3-19.
- FORSS, S., STREBEL, K., BECK, E. y SCHALLER, H. 1984. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res*, 12, 6587-601.
- 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 (Pt 3), 625-37.
- FOX, M. P., OTTO, M. J. y MCKINLAY, M. A. 1986. Prevention of rhinovirus and poliovirus uncoating by WIN 51711, a new antiviral drug. *Antimicrob Agents Chemother*, 30, 110-6.
- FREDERICKSEN, B. L. y WHITT, M. A. 1998. Attenuation of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding mutant glycoproteins demonstrate a critical role for maintaining a high pH threshold for membrane fusion in viral fitness. *Virology*, 240, 349-58.
- FRY, E. E., LEA, S. M., JACKSON, T., NEWMAN, J. W., ELLARD, F. M., BLAKEMORE, W. E., ABU-GHAZALEH, R., SAMUEL, A., KING, A. M. y STUART, D. I. 1999. The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *EMBO J*, 18, 543-54.
- FRY, E. E., NEWMAN, J. W., CURRY, S., NAJJAM, S., JACKSON, T., BLAKEMORE, W., LEA, S. M., MILLER, L., BURMAN, A., KING, A. M. y STUART, D. I. 2005. Structure of Foot-and-mouth disease virus serotype A10 61 alone and complexed with oligosaccharide receptor: receptor conservation in the face of antigenic variation. *J Gen Virol*, 86, 1909-20.
- FUCHS, R. y BLAAS, D. 2010. Uncoating of human rhinoviruses. *Rev Med Virol*, 20, 281-97.
- FUKUNAGA, Y., KUMANOMIDO, T., IMAGAWA, H., ANDO, Y., KAMADA, M., WADA, R. y AKIYAMA, Y. 1981. Isolation of picornavirus from horses associated with Getah virus infection. *Nihon Juigaku Zasshi*, 43, 569-72.
- GARCÍA-ARRIAZA, J., MANRUBIA, S. C., TOJA, M., DOMINGO, E. y ESCARMÍS, C. 2004. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol*, 78, 11678-85.
- GARCÍA-BRIONES, M., ROSAS, M. F., GONZÁLEZ-MAGALDI, M., MARTÍN-ACEBES, M. A., SOBRINO, F. y ARMAS-ORTELA, R. 2006. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology*, 349, 409-21.
- GARD, S. 1957. Inactivation of poliovirus by formaldehyde: theoretical and practical aspects. Bulletin of the World Health Organization.
- GARRIGA, D., PICKL-HERK, A., LUQUE, D., WRUSS, J., CASTON, J. R., BLAAS, D. y VERDAGUER, N. 2012. Insights into minor group rhinovirus uncoating: the X-ray structure of the HRV2 empty capsid. *PLoS Pathog*, 8, e1002473.
- GIRANDA, V. L., HEINZ, B. A., OLIVEIRA, M. A., MINOR, I., KIM, K. H., KOLATKAR, P. R., ROSSMANN, M. G. y RUECKERT, R. R. 1992. Acid-induced structural changes in human rhinovirus 14: possible role in uncoating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10213-7.

BIBLIOGRAFÍA

- GIRAUDO, A. T., BECK, E., STREBEL, K., DE MELLO, P. A., LA TORRE, J. L., SCODELLER, E. A. y BERGMANN, I. E. 1990. Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology*, 177, 780-3.
- GONZALEZ-MAGALDI, M., MARTIN-ACEBES, M. A., KREMER, L. y SOBRINO, F. 2014. Membrane topology and cellular dynamics of foot-and-mouth disease virus 3A protein. *PLoS One*, 9, e106685.
- GOODWIN, S., TUTHILL, T. J., ARIAS, A., KILLINGTON, R. A. y ROWLANDS, D. J. 2009. Foot-and-mouth disease virus assembly: processing of recombinant capsid precursor by exogenous protease induces self-assembly of pentamers in vitro in a myristoylation-dependent manner. *J Virol*, 83, 11275-82.
- GRAVES, J. H. 1963. Formaldehyde Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus as Applied to Vaccine Preparation. *Am J Vet Res*, 24, 1131-6.
- GROPPELLI, E., TUTHILL, T. J. y ROWLANDS, D. J. 2010. Cell entry of the aphthovirus equine rhinitis A virus is dependent on endosome acidification. *J Virol*, 84, 6235-40.
- GRUBMAN, M. J. 2005. Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals*, 33, 227-34.
- GRUBMAN, M. J. y BAXT, B. 2004. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 17, 465-93.
- GRUBMAN, M. J., MORAES, M. P., DIAZ-SAN SEGUNDO, F., PENA, L. y DE LOS SANTOS, T. 2008. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 53, 8-17.
- GUIRAKHOO, F., HUNT, A. R., LEWIS, J. G. y ROEHRIG, J. T. 1993. Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH. *Virology*, 194, 219-23.
- GUZYLACK-PIRIOU, L., BALMELLI, C., MCCULLOUGH, K. C. y SUMMERFIELD, A. 2004. Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12. *Immunology*, 112, 28-37.
- GUZYLACK-PIRIOU, L., BERGAMIN, F., GERBER, M., MCCULLOUGH, K. C. y SUMMERFIELD, A. 2006. Plasmacytoid dendritic cell activation by foot-and-mouth disease virus requires immune complexes. *Eur J Immunol*, 36, 1674-83.
- HAN, S. C., GUO, H. C., SUN, S. Q., JIN, Y., WEI, Y. Q., FENG, X., YAO, X. P., CAO, S. Z., XIANG LIU, D. y LIU, X. T. 2016. Productive Entry of Foot-and-Mouth Disease Virus via Macropinocytosis Independent of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Sci Rep*, 6, 19294.
- HARWOOD, L. J., GERBER, H., SOBRINO, F., SUMMERFIELD, A. y MCCULLOUGH, K. C. 2008. Dendritic cell internalization of foot-and-mouth disease virus: influence of heparan sulfate binding on virus uptake and induction of the immune response. *J Virol*, 82, 6379-94.
- HEGDE, N. R., MADDUR, M. S., RAO, P. P., KAVERI, S. V. y BAYRY, J. 2009. Thermostable foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate for endemic countries: a perspective. *Vaccine*, 27, 2199-201.
- HERNÁNDEZ, I. D. L. H. 2014. *Factores determinantes del reconocimiento de nucleótidos en el virus de la fiebre aftosa*. Universidad Autónoma de Madrid.
- HERRERA, M., GRANDE-PEREZ, A., PERALES, C. y DOMINGO, E. 2008. Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J Gen Virol*, 89, 232-44.
- HEWAT, E. A. y BLAAS, D. 2004. Cryoelectron microscopy analysis of the structural changes associated with human rhinovirus type 14 uncoating. *J Virol*, 78, 2935-42.
- HEWAT, E. A., NEUMANN, E. y BLAAS, D. 2002. The concerted conformational changes during human rhinovirus 2 uncoating. *Mol Cell*, 10, 317-26.
- HIERHOLZER JC, K. R. 1996. Virus isolation and quantification. *En: MAHY BWJ, K. H. (ed.) Virology Methods Manual*. London, San Diego: Academic Press.
- HINDIYEH, M., LI, Q. H., BASAVAPPA, R., HOGLE, J. M. y CHOW, M. 1999. Poliovirus mutants at histidine 195 of VP2 do not cleave VP0 into VP2 and VP4. *J Virol*, 73, 9072-9.
- HOFER, B., STECK, F., GERBER, H., LOHRER, J., NICOLET, J., PACCAUD, M.F. 1973. *En: BRYANS, J. A. T. B., H. (ed.) Equine Infectious Disease III*. Karger, Basel.
- HOGLE, J. M., CHOW, M. y FILMAN, D. J. 1985. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229, 1358-65.

- HOLMES, D. F., KEMEN, M.J. AND COGGINS, L. 1978. En: BRYAN, J. T. A. B., H. (ed.) *Equine Infectious Disease IV*. Karger, Bsel.
- HORSINGTON, J., LYNCH, S. E., GILKERSON, J. R., STUDDERT, M. J. y HARTLEY, C. A. 2013. Equine picornaviruses: well known but poorly understood. *Vet Microbiol*, 167, 78-85.
- HUOTARI, J. y HELENIUS, A. 2011. Endosome maturation. *EMBO J*, 30, 3481-500.
- HUSS, M., INGENHORST, G., KONIG, S., GASSEL, M., DROSE, S., ZEECK, A., ALTENDORF, K. y WIECZOREK, H. 2002. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *J Biol Chem*, 277, 40544-8.
- INOUE, H., NOJIMA, H. y OKAYAMA, H. 1990. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96, 23-8.
- IWASAKI, A. y KELSALL, B. L. 2000. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med*, 191, 1381-94.
- JACOBSON, M. F. y BALTIMORE, D. 1968. Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat protein. *J Mol Biol*, 33, 369-78.
- JAMAL, S. M. y BELSHAM, G. J. 2013. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res*, 44, 116.
- JANEWAY, C. A., JR. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1, 1-13.
- JIANG, P., LIU, Y., MA, H. C., PAUL, A. V. y WIMMER, E. 2014. Picornavirus morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 78, 418-37.
- JOHNS, H. L., BERRYMAN, S., MONAGHAN, P., BELSHAM, G. J. y JACKSON, T. 2009. A dominant-negative mutant of rab5 inhibits infection of cells by foot-and-mouth disease virus: implications for virus entry. *J Virol*, 83, 6247-56.
- JOVIC, M., SHARMA, M., RAHAJENG, J. y CAPLAN, S. 2010. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol*, 25, 99-112.
- JUNQUEIRA, L. C. J. C. 2003. *Basic Histology*.
- KAMBLE, N. M., JAWALE, C. V. y LEE, J. H. 2016. Interaction of a live attenuated Salmonella Gallinarum vaccine candidate with chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Avian Pathol*, 1-24.
- KIM, S. M., KIM, S. K., PARK, J. H., LEE, K. N., KO, Y. J., LEE, H. S., SEO, M. G., SHIN, Y. K. y KIM, B. 2014. A recombinant adenovirus bicistronically expressing porcine interferon-alpha and interferon-gamma enhances antiviral effects against foot-and-mouth disease virus. *Antiviral Res*, 104, 52-8.
- KNIFE, T., RIEDER, E., BAXT, B., WARD, G. y MASON, P. W. 1997. Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *J Virol*, 71, 2851-6.
- KNOX, C., MOFFAT, K., ALI, S., RYAN, M. y 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, 687-96.
- KOTECHA, A., SEAGO, J., SCOTT, K., BURMAN, A., LOUREIRO, S., REN, J., PORTA, C., GINN, H. M., JACKSON, T., PEREZ-MARTIN, E., SIEBERT, C. A., PAUL, G., HUISKONEN, J. T., JONES, I. M., ESNOUF, R. M., FRY, E. E., MAREE, F. F., CHARLESTON, B. y STUART, D. I. 2015. Structure-based energetics of protein interfaces guides foot-and-mouth disease virus vaccine design. *Nat Struct Mol Biol*, 22, 788-94.
- LACROIX, C., QUEROL-AUDI, J., ROCHE, M., FRANCO, D., FROEYEN, M., GUERRA, P., TERME, T., VANELLE, P., VERDAGUER, N., NEYTS, J. y LEYSSEN, P. 2014. A novel benzonitrile analogue inhibits rhinovirus replication. *J Antimicrob Chemother*, 69, 2723-32.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LANNES, N., PYTHON, S. y SUMMERFIELD, A. 2012. Interplay of foot-and-mouth disease virus, antibodies and plasmacytoid dendritic cells: virus opsonization under non-neutralizing conditions results in enhanced interferon-alpha responses. *Vet Res*, 43, 64.
- LAZAR, G. A., MARSHALL, S. A., PLECS, J. J., MAYO, S. L. y DESJARLAIS, J. R. 2003. Designing proteins for therapeutic applications. *Curr Opin Struct Biol*, 13, 513-8.

BIBLIOGRAFÍA

- LEA, S., HERNANDEZ, J., BLAKEMORE, W., BROCCCHI, E., CURRY, S., DOMINGO, E., FRY, E., ABU-GHAZALEH, R., KING, A., NEWMAN, J. y ET AL. 1994. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 2, 123-39.
- LI, F., BROWNING, G. F., STUDDERT, M. J. y CRABB, B. S. 1996. Equine rhinovirus 1 is more closely related to foot-and-mouth disease virus than to other picornaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 990-5.
- LIANG, T., YANG, D., LIU, M., SUN, C., WANG, F., WANG, J., WANG, H., SONG, S., ZHOU, G. y YU, L. 2014. Selection and characterization of an acid-resistant mutant of serotype O foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 159, 657-67.
- LIU, Y., SHENG, J., FOKINE, A., MENG, G., SHIN, W. H., LONG, F., KUHN, R. J., KIHARA, D. y ROSSMANN, M. G. 2015. Structure and inhibition of EV-D68, a virus that causes respiratory illness in children. *Science*, 347, 71-4.
- LIU, Y. J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*, 23, 275-306.
- LÓPEZ DE QUINTO, S. y MARTÍNEZ-SALAS, E. 1998. Parameters influencing translational efficiency in aphthovirus IRES-based bicistronic expression vectors. *Gene*, 217, 51-6.
- LUO, M., VRIEND, G., KAMER, G., MINOR, I., ARNOLD, E., ROSSMANN, M. G., BOEGE, U., SCRABA, D. G., DUKE, G. M. y PALMENBERG, A. C. 1987. The atomic structure of Mengo virus at 3.0 Å resolution. *Science*, 235, 182-91.
- LURIA, S. E. y BURROUS, J. W. 1957. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Bacteriol*, 74, 461-76.
- LYU, K., DING, J., HAN, J. F., ZHANG, Y., WU, X. Y., HE, Y. L., QIN, C. F. y CHEN, R. 2014. Human enterovirus 71 uncoating captured at atomic resolution. *J Virol*, 88, 3114-26.
- MAREE, F. F., BLIGNAUT, B., DE BEER, T. A. y RIEDER, E. 2013. Analysis of SAT type foot-and-mouth disease virus capsid proteins and the identification of putative amino acid residues affecting virus stability. *PLoS One*, 8, e61612.
- MARSH, M. y HELENIUS, A. 1989. Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res*, 36, 107-51.
- MARSHANSKY, V. y FUTAI, M. 2008. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 415-26.
- MARTIN-ACEBES, M. A., BLAZQUEZ, A. B., DE OYA, N. J., ESCRIBANO-ROMERO, E., SHI, P. Y. y SAIZ, J. C. 2013. A single amino acid substitution in the core protein of West Nile virus increases resistance to acidotropic compounds. *PLoS One*, 8, e69479.
- MARTÍN-ACEBES, M. A., GONZÁLEZ-MAGALDI, M., SANDVIG, K., SOBRINO, F. y ARMAS-ORTELA, R. 2007. Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. *Virology*, 369, 105-18.
- MARTÍN-ACEBES, M. A., RINCON, V., ARMAS-ORTELA, R., MATEU, M. G. y SOBRINO, F. 2010. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid lability and confer resistance to acid-dependent uncoating inhibition. *J Virol*, 84, 2902-12.
- MARTÍN-ACEBES, M. A., VÁZQUEZ-CALVO, A., GONZÁLEZ-MAGALDI, M. y SOBRINO, F. 2011a. Foot-and-mouth disease virus particles inactivated with binary ethylenimine are efficiently internalized into cultured cells. *Vaccine*, 29, 9655-62.
- MARTÍN-ACEBES, M. A., VÁZQUEZ-CALVO, A., RINCÓN, V., MATEU, M. G. y SOBRINO, F. 2011b. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid resistance. *J Virol*, 85, 2733-40.
- MARTÍNEZ-SALAS, E. 2008. The impact of RNA structure on picornavirus IRES activity. *Trends Microbiol*, 16, 230-7.
- MARTÍNEZ-SALAS, E., SAIZ, M. y SOBRINO, F. 2008. Foot-and-Mouth Disease Virus. En: SOBRINO, T. C. M. A. F. (ed.) *Animal Molecular Biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- MATEO, R. 2004. *Dissección funcional de las interfases entre subunidades de la cápsida del virus de la fiebre aftosa, y aproximaciones al diseño de cápsidas más estables*. Universidad Autónoma de Madrid.

- MATEO, R., DIAZ, A., BARANOWSKI, E. y MATEU, M. G. 2003. Complete alanine scanning of intersubunit interfaces in a 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.
- MATEO, R., LUNA, E. y MATEU, M. G. 2007. Thermostable variants are not generally represented in foot-and-mouth disease virus quasispecies. *J Gen Virol*, 88, 859-64.
- MATEO, R., LUNA, E., RINCON, V. y MATEU, M. G. 2008. Engineering viable foot-and-mouth disease viruses with increased thermostability as a step in the development of improved vaccines. *J Virol*, 82, 12232-40.
- MATEU, M. G. 1995. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res*, 38, 1-24.
- MATEU, M. G. 2013. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch Biochem Biophys*, 531, 65-79.
- MATEU, M. G. 2016. The Foot-and-Mouth Disease Virion: Structure and Function
- En: SOBRINO, F. Y. D. E. (ed.) *Foot-and-Mouth Disease Virus*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- MATEU, M. G. 2017. FMDV virion structure and function. En: SOBRINO, F. Y. D., E. (ed.) *Foot-and mouth disease virus*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- MATEU, M. G., MARTINEZ, 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 (Pt 3), 629-37.
- MATEU, M. G., MARTINEZ, M. A., ROCHA, E., ANDREU, D., PAREJO, J., GIRALT, E., SOBRINO, F. y DOMINGO, E. 1989. Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5883-7.
- MATEU, M. G., ROCHA, E., VICENTE, O., VAYREDA, F., NAVALPOTRO, C., ANDREU, D., PEDROSO, E., GIRALT, E., ENJUANES, L. y DOMINGO, E. 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res*, 8, 261-74.
- 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.
- MATEU, M. G. Y. V., N. 2004. Functional and structural aspects of the interaction of foot-and-mouth disease virus with antibodies. En: E., F. S. Y. D. (ed.) *Foot and mouth disease. Current Perspectives*. Norfolk, United Kingdom: Horizon Bioscience.
- MCCULLOUGH, K. C., PARKINSON, D. y CROWTHER, J. R. 1988. Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*, 65, 187-91.
- MCCULLOUGH, K. C., RUGGLI, N. y SUMMERFIELD, A. 2009. Dendritic cells--at the front-line of pathogen attack. *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 7-15.
- MCCULLOUGH, K. C., SCHAFFNER, R., FRAEFEL, W. y KIHM, U. 1993. The relative density of CD44-positive porcine monocytic cell populations varies between isolations and upon culture and influences susceptibility to infection by African swine fever virus. *Immunol Lett*, 37, 83-90.
- MCCULLOUGH, K. C. Y. S. F. 2004. Immunology of Foot-and-mouth disease En: DOMINGO, F. S. A. E. (ed.) *Foot and Mouth disease: current perspectives*. Norfolk: Horizon Bioscience.
- MEDINA, M., DOMINGO, E., BRANGWYN, J. K. y BELSHAM, G. J. 1993. The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology*, 194, 355-9.
- MEJRI, N. y BROSSARD, M. 2007. Splenic dendritic cells pulsed with Ixodes ricinus tick saliva prime naive CD4+T to induce Th2 cell differentiation in vitro and in vivo. *Int Immunol*, 19, 535-43.
- MELOEN, R. H., ROWLANDS, D. J. y BROWN, F. 1979. Comparison of the antibodies elicited by the individual structural polypeptides of foot-and mouth disease and polio viruses. *J Gen Virol*, 45, 761-3.
- MEUNIER, E. y BROZ, P. 2015. Interferon-inducible GTPases in cell autonomous and innate immunity. *Cell Microbiol*, 18, 168-80.
- MOFFAT, K., KNOX, C., HOWELL, G., CLARK, S. J., YANG, H., BELSHAM, G. J., RYAN, M. y WILEMAN, T. 2007. Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by

BIBLIOGRAFÍA

- 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. y WILEMAN, T. 2004. The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J Gen Virol*, 85, 933-46.
- MORAES, M. P., CHINSANGARAM, J., BRUM, M. C. y 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, 268-79.
- MORAES, M. P., DE LOS SANTOS, T., KOSTER, M., TURECEK, T., WANG, H., ANDREYEV, V. G. y GRUBMAN, M. J. 2007. Enhanced antiviral activity against foot-and-mouth disease virus by a combination of type I and II porcine interferons. *J Virol*, 81, 7124-35.
- MOSCUFO, N., SIMONS, J. y CHOW, M. 1991. Myristoylation is important at multiple stages in poliovirus assembly. *J Virol*, 65, 2372-80.
- MULCAHY, G., GALE, C., ROBERTSON, P., IYISAN, S., DIMARCHI, R. D. y DOEL, T. R. 1990. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 8, 249-56.
- 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, 7698-706.
- NEWMAN, J. F., ROWLANDS, D. J. y BROWN, F. 1973. A physico-chemical sub-grouping of the mammalian picornaviruses. *J Gen Virol*, 18, 171-80.
- NORDLUND, H. R., HYTONEN, V. P., LAITINEN, O. H., UOTILA, S. T., NISKANEN, E. A., SAVOLAINEN, J., PORKKA, E. y KULOMAA, M. S. 2003. Introduction of histidine residues into avidin subunit interfaces allows pH-dependent regulation of quaternary structure and biotin binding. *FEBS Lett*, 555, 449-54.
- NUÑEZ, J. I., BARANOWSKI, E., MOLINA, N., RUIZ-JARABO, C. M., SANCHEZ, C., DOMINGO, E. y SOBRINO, F. 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, 3977-83.
- O'DONNELL, V., LAROCCO, M. y BAXT, B. 2008. Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *J Virol*, 82, 9075-85.
- O'DONNELL, V., LAROCCO, M., DUQUE, H. y BAXT, B. 2005. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J Virol*, 79, 8506-18.
- O'DONNELL, V. K., PACHECO, J. M., HENRY, T. M. y MASON, P. W. 2001. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology*, 287, 151-62.
- OBEID, J., HU, Y. y SLINGLUFF, C. L., JR. 2015. Vaccines, Adjuvants, and Dendritic Cell Activators--Current Status and Future Challenges. *Semin Oncol*, 42, 549-61.
- OHKUMA, S. y POOLE, B. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 3327-31.
- OIE 2015a. Fiebre Aftosa. N.B. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2012. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2015*. OIE-World Organisation for Animal Health.
- OIE 2015b. Infección por el virus de la fiebre aftosa. *Código Sanitario para los Animales Terrestres*. OIE-World Organisation for Animal Health.
- OSICEANU, A. M., MURAO, L. E., KOLLANUR, D., SWINNEN, J., DE VLEESCHAUWER, A. R., LEFEBVRE, D. J., DE CLERCQ, K., NEYTS, J. y GORIS, N. 2014. In vitro surrogate models to aid in the development of antivirals for the containment of foot-and-mouth disease outbreaks. *Antiviral Res*, 105, 59-63.
- PACHECO, J. M., BUTLER, J. E., JEW, J., FERMAN, G. S., ZHU, J. y GOLDE, W. T. 2010. IgA antibody response of swine to foot-and-mouth disease virus infection and vaccination. *Clin Vaccine Immunol*, 17, 550-8.
- PALMER, P., CHARLEY, B., ROMBAUT, B., DAERON, M. y LEBON, P. 2000. Antibody-dependent induction of type I interferons by poliovirus in human mononuclear blood cells requires the type II fcgamma receptor (CD32). *Virology*, 278, 86-94.

- PARK, J. N., KO, M. K., KIM, R. H., PARK, M. E., LEE, S. Y., YOON, J. E., CHOI, J. H., YOU, S. H., PARK, J. W., LEE, K. N., CHUN, J. E., KIM, S. M., TARK, D., LEE, H. S., KO, Y. J., KIM, B., LEE, M. H. y PARK, J. H. 2016. Construction of stabilized and tagged foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*, 237, 187-191.
- PARRY, N., FOX, G., ROWLANDS, D., BROWN, F., FRY, E., ACHARYA, R., LOGAN, D. y STUART, D. 1990. Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 347, 569-72.
- PAUL, A. V. 2002. Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. En: (ED.), B. L. S. A. E. W. (ed.) *Molecular biology of picornaviruses*. Washington: ASM Press.
- PERALES, C., AGUDO, R., TEJERO, H., MANRUBIA, S. C. y DOMINGO, E. 2009. Potential benefits of sequential inhibitor-mutagen treatments of RNA virus infections. *PLoS Pathog*, 5, e1000658.
- PEREIRA, H. G. 1981. Foot-and-mouth disease En: E.P.J., G. (ed.) *Virus disease of food animal*. New York: Academic Press.
- PEREZ, L. y CARRASCO, L. 1993. Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J Virol*, 67, 4543-8.
- PICKL-HERK, A., LUQUE, D., VIVES-ADRIAN, L., QUEROL-AUDI, J., GARRIGA, D., TRUS, B. L., VERDAGUER, N., BLAAS, D. y CASTON, J. R. 2013. Uncoating of common cold virus is preceded by RNA switching as determined by X-ray and cryo-EM analyses of the subviral A-particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 20063-8.
- PIERSCHBACHER, M. D. y RUOSLAHTI, E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309, 30-3.
- PLUMMER, G. 1962. An equine respiratory virus with enterovirus properties. *Nature*, 195, 519-20.
- PORTA, C., KOTTECHA, A., BURMAN, A., JACKSON, T., REN, J., LOUREIRO, S., JONES, I. M., FRY, E. E., STUART, D. I. y CHARLESTON, B. 2013. Rational engineering of recombinant picornavirus capsids to produce safe, protective vaccine antigen. *PLoS Pathog*, 9, e1003255.
- PRCHLA, E., PLANK, C., WAGNER, E., BLAAS, D. y FUCHS, R. 1995. Virus-mediated release of endosomal content in vitro: different behavior of adenovirus and rhinovirus serotype 2. *J Cell Biol*, 131, 111-23.
- PRINGLE, C. R. 1964. Genetic aspects of the thermal inactivation properties of foot-and-mouth disease virus strain. *Bull Off Int Epizoot*, 61, 619-628.
- PRINGLE, C. R. 1999. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch Virol*, 144, 2065-70.
- QUATTROCCHI, V., LANGELLOTTI, C., PAPPALARDO, J. S., OLIVERA, V., DI GIACOMO, S., VAN ROOIJEN, N., MONGINI, C., WALDNER, C. y ZAMORANO, P. I. 2011. Role of macrophages in early protective immune responses induced by two vaccines against foot and mouth disease. *Antiviral Res*, 92, 262-70.
- RANDRUP, A. 1954. Ultracentrifugation of the virus of foot-and-mouth disease. IV. Splitting of the greater complement-fixing particle. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 34, 366-74.
- RAO, M. G., BUTCHAIHAH, G. y SEN, A. K. 1994. Antibody response to 146S particle, 12S protein subunit and isolated VP1 polypeptide of foot-and-mouth disease virus type Asia-1. *Vet Microbiol*, 39, 135-43.
- REN, J., WANG, X., HU, Z., GAO, Q., SUN, Y., LI, X., PORTA, C., WALTER, T. S., GILBERT, R. J., ZHAO, Y., AXFORD, D., WILLIAMS, M., MCAULEY, K., ROWLANDS, D. J., YIN, W., WANG, J., STUART, D. I., RAO, Z. y FRY, E. E. 2013. Picornavirus uncoating intermediate captured in atomic detail. *Nat Commun*, 4, 1929.
- RHIM, J. S. y SCHELL, K. 1967. Cytopathic and plaque assay of rubella virus in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *Proc Soc Exp Biol Med*, 125, 602-6.
- RIGDEN, R. C., CARRASCO, C. P., SUMMERFIELD, A. y KC, M. C. 2002. Macrophage phagocytosis of foot-and-mouth disease virus may create infectious carriers. *Immunology*, 106, 537-48.
- RINCÓN, V. 2012. *Relaciones estructura-función en la capsida del virus de la Fiebre Aftosa: algunas implicaciones para el desarrollo de vacunas y antivirales*. Universidad Autónoma de Madrid.
- RINCÓN, V., RODRÍGUEZ-HUETE, A., LÓPEZ-ARGUELLO, S., IBARRA-MOLERO, B., SÁNCHEZ-RUIZ, J. M., HARMSEN, M. M. y MATEU, M. G. 2014. Identification of the structural basis of thermal lability of a virus provides a rationale for improved vaccines. *Structure*, 22, 1560-70.

BIBLIOGRAFÍA

- RINK, J., GHIGO, E., KALAIIDZIDIS, Y. y ZERIAL, M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122, 735-49.
- RODRIGUEZ-PULIDO, M., BORREGO, B., SOBRINO, F. y SAIZ, M. 2011. RNA structural domains in noncoding regions of the foot-and-mouth disease virus genome trigger innate immunity in porcine cells and mice. *J Virol*, 85, 6492-501.
- RODRIGUEZ, L. L. y GRUBMAN, M. J. 2009. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*, 27 Suppl 4, D90-4.
- ROSENWIRTH, B., OREN, D. A., ARNOLD, E., KIS, Z. L. y EGGERS, H. J. 1995. SDZ 35-682, a new picornavirus capsid-binding agent with potent antiviral activity. *Antiviral Res*, 26, 65-82.
- ROSSMANN, M. G., ARNOLD, E., ERICKSON, J. W., FRANKENBERGER, E. A., GRIFFITH, J. P., HECHT, H. J., JOHNSON, J. E., KAMER, G., LUO, M., MOSSER, A. G. y ET AL. 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317, 145-53.
- ROSSMANN, M. G. y JOHNSON, J. E. 1989. Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem*, 58, 533-73.
- ROTHENFUSSER, S., TUMA, E., ENDRES, S. y HARTMANN, G. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol*, 63, 1111-9.
- ROWLANDS, D. J., SANGAR, D. V. y BROWN, F. 1975. A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and mouth disease virus. *J Gen Virol*, 26, 227-38.
- RUECKERT, R. R. 1990. *Virology*, New York, Raven.
- RYAN, M. D., KING, A. M. y THOMAS, G. P. 1991. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol*, 72 (Pt 11), 2727-32.
- SA-CARVALHO, D., RIEDER, E., BAXT, B., RODARTE, R., TANURI, A. y 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, 5115-23.
- SÁIZ, M., GÓMEZ, S., MARTÍNEZ-SALAS, E. y SOBRINO, F. 2001. Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol*, 82, 93-101.
- SALT, J. S., MULCAHY, G. y KITCHING, R. P. 1996. Isotype-specific antibody responses to foot-and-mouth disease virus in sera and secretions of 'carrier' and 'non-carrier' cattle. *Epidemiol Infect*, 117, 349-60.
- SÁNCHEZ-APARICIO, M. T., ROSAS, M. F. y SOBRINO, F. 2013. Characterization of a nuclear localization signal in the foot-and-mouth disease virus polymerase. *Virology*, 444, 203-10.
- SHELDON, J., BEACH, N. M., MORENO, E., GALLEGO, I., PINEIRO, D., MARTINEZ-SALAS, E., GREGORI, J., QUER, J., ESTEBAN, J. I., RICE, C. M., DOMINGO, E. y PERALES, C. 2014. Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus. *J Virol*, 88, 12098-111.
- SIERRA, M., AIRAKSINEN, A., GONZALEZ-LOPEZ, C., AGUDO, R., ARIAS, A. y DOMINGO, E. 2007. Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol*, 81, 2012-24.
- SINKORA, J., REHAKOVA, Z., SAMANKOVA, L., HAVERSON, K., BUTLER, J. E., ZWART, R. y BOERSMA, W. 2001. Characterization of monoclonal antibodies recognizing immunoglobulin kappa and lambda chains in pigs by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol*, 80, 79-91.
- SKERN, T., TORGERSEN, H., AUER, H., KUECHLER, E. y BLAAS, D. 1991. Human rhinovirus mutants resistant to low pH. *Virology*, 183, 757-63.
- SMITH, T. J., KREMER, M. J., LUO, M., VRIEND, G., ARNOLD, E., KAMER, G., ROSSMANN, M. G., MCKINLAY, M. A., DIANA, G. D. y OTTO, M. J. 1986. The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science*, 233, 1286-93.
- SOBRINO, F., DAVILA, M., ORTIN, J. y DOMINGO, E. 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology*, 128, 310-8.
- SOBRINO, F., DOMINGO, E. 2004. *Foot and mouth disease. Current Perspectives.*, Norfolk, Horizon bioscience.
- SOBRINO, F., SAIZ, M., JIMENEZ-CLAVERO, M. A., NUNEZ, 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.

- SOLOV'EV, V. D. 1973. The action of interferon in cell culture *En: BEKTEMIROV, V. D. S. E. A. T. A. (ed.) Interferon, Theory and applications*. New York: Plenum Press.
- STEVENSON, R. A., HUANG, J. A., STUDDERT, M. J. y HARTLEY, C. A. 2004. Sialic acid acts as a receptor for equine rhinitis A virus binding and infection. *J Gen Virol*, 85, 2535-43.
- STOKER, M. y MACPHERSON, I. 1964. Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and Its Derivatives. *Nature*, 203, 1355-7.
- STUDDERT, M. J. y GLEESON, L. J. 1977. Isolation of equine rhinovirus type 1. *Aust Vet J*, 53, 452.
- STUDDERT, M. J. y GLEESON, L. J. 1978. Isolation and characterisation of an equine rhinovirus. *Zentralbl Veterinarmed B*, 25, 225-37.
- SUMMERFIELD, A., GUZYLACK-PIRIOU, L., HARWOOD, L. y MCCULLOUGH, K. C. 2009. Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: current understanding and future directions. *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 205-10.
- SWIECKI, M. y COLONNA, M. 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 15, 471-85.
- TABOGA, O., TAMI, C., CARRILLO, E., NUNEZ, J. I., RODRIGUEZ, A., SAIZ, J. C., BLANCO, E., VALERO, M. L., ROIG, X., CAMARERO, J. A., ANDREU, D., MATEU, M. G., GIRALT, E., DOMINGO, E., SOBRINO, F. y PALMA, E. L. 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, 2606-14.
- TAKADA, Y., YE, X. y SIMON, S. 2007. The integrins. *Genome Biol*, 8, 215.
- TOJA, M., ESCARMIS, C. y DOMINGO, E. 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res*, 64, 161-71.
- TOSTESON, M. T. y CHOW, M. 1997. Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J Virol*, 71, 507-11.
- TULLOCH, F., GARRY, A., D. RYAN L. AND M. 2017. Foot-and-mouth Disease Virus Proteinases and Polyprotein Processing. *En: SOBRINO, F. A. D., E. (ed.) Foot-and-mouth Disease Virus*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- TUTHILL, T. J., GROPELLI, E., HOGLE, J. M. y ROWLANDS, D. J. 2010. Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 343, 43-89.
- TUTHILL, T. J., HARLOS, K., WALTER, T. S., KNOWLES, N. J., GROPELLI, E., ROWLANDS, D. J., STUART, D. I. y FRY, E. E. 2009. Equine rhinitis A virus and its low pH empty particle: clues towards an aphthovirus entry mechanism? *PLoS Pathog*, 5, e1000620.
- TWOMEY, T., FRANCE, L. L., HASSARD, S., BURRAGE, T. G., NEWMAN, J. F. y BROWN, F. 1995. Characterization of an acid-resistant mutant of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 206, 69-75.
- VAKHARIA, V. N., DEVANEY, M. A., MOORE, D. M., DUNN, J. J. y GRUBMAN, M. J. 1987. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J Virol*, 61, 3199-207.
- VAN VLIJMEN, H. W., CURRY, S., SCHAEFER, M. y 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.
- VÁZQUEZ-CALVO, A. 2012. *Tesis Doctoral. Estudio de los requerimientos para la entrada del virus de la fiebre aftosa en cultivos celulares y caracterización del ácido valproico como compuesto antiviral*. Universidad Autónoma de Madrid.
- VÁZQUEZ-CALVO, A., SAIZ, J. C., MCCULLOUGH, K. C., SOBRINO, F. y MARTÍN-ACEBES, M. A. 2012. Acid-dependent viral entry. *Virus Res*, 167, 125-37.
- VERLINDEN, Y., CUCONATI, A., WIMMER, E. y ROMBAUT, B. 2000. Cell-free synthesis of poliovirus: 14S subunits are the key intermediates in the encapsidation of poliovirus RNA. *J Gen Virol*, 81, 2751-4.
- WANG, H., SONG, S., ZENG, J., ZHOU, G., YANG, D., LIANG, T. y YU, L. 2014. Single amino acid substitution of VP1 N17D or VP2 H145Y confers acid-resistant phenotype of type Asia1 foot-and-mouth disease virus. *Virus Sin*, 29, 103-11.

BIBLIOGRAFÍA

- WELLEK, B., HAHN, H. y OPFERKUCH, W. 1976. Opsonizing activities of IgG, IgM antibodies and the C3b inactivator-cleaved third component of complement in macrophage phagocytosis. *Agents Actions*, 6, 260-2.
- XIANG, W., CUCONATI, A., HOPE, D., KIRKEGAARD, K. y WIMMER, E. 1998. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol*, 72, 6732-41.
- YAMASHIRO, D. J., FLUSS, S. R. y MAXFIELD, F. R. 1983. Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump. *J Cell Biol*, 97, 929-34.