



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica.

**“Estudios sobre la proteína 3A en la
transcripción/replicación del Virus de la Fiebre Aftosa”**

Lic. Cecilia Maricel Lotufo

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires.
Area: Farmacia y Bioquímica. Subárea: Ciencias Biológicas.

Director de tesis: Dra. Nora Marta Mattion

Director Asistente y Consejero de estudios: Dr. Maximiliano Wilda

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

Buenos Aires, 2016

Agradecimientos.

En primer lugar, me gustaría agradecer a todos los miembros del Instituto Cesar Milstein, y de FEVAN. Lugares en donde encontré muy buena onda por parte de todos, la predisposición de ayudar al que recién entra desde el principio y su apoyo durante todo el trabajo. Especialmente al Dr. José La Torre quien me abrió las puertas del Instituto.

Agradezco en particular a la Dra. Nora Mattion, quien confió en mí para llevar a cabo el proyecto y me brindó todo su apoyo para que lo pudiera concluir en tiempo y forma.

Al Dr. Maximiliano Wilda (Maxx), quien aceptó ser mi director adjunto y me ayudó a sobrepasar los obstáculos que fueron apareciendo a lo largo del camino. Gracias por los consejos, predisposición y la buena onda característica.

Al Dr. Pablo Grigera, por su amplia participación y entusiasmo en el trabajo de ELISA, el cual sin su colaboración no habría sido posible. También a la colaboración de la Dra. Blanca Robiolo en la discusión de los datos y al MV. Osvaldo Periolo. A la Dra. Cristina Seki, quien nos aportó el anticuerpo 3H7 a caracterizar.

A todo el personal de apoyo y técnico del Instituto Milstein que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en lo que necesitara, en especial a Carmen, María, Lety y Dani.

A todos mis compañeros de laboratorio, a Marina, Carina y Carlos, que me salvaron varias veces cuando tenía mil dudas.

A quienes además de mis compañeras se convirtieron en mis amigas, Ceci y Yesi. En particular a Sabri, quien me aconsejó tanto como en lo personal como en lo técnico y me apoyó cuando todo parecía que no salía bien.

A mi familia que me apoyó incondicionalmente siempre para que pueda realizar todos mis sueños.

A mis amigas de la vida, Joha, Juli, Ceci, Ana, Lu y Dian, a quienes adoro, con ellas compartí buenos y malos momentos, y que a pesar de todas las veces que no las pude ver, me siguen queriendo.

A Roque, por su incondicional apoyo en todos mis proyectos, por su paciencia, por hacerme reír y acompañarme siempre. Por ser mi amor y compañero de vida.

A todos quienes aportaron de una u otra forma a mi crecimiento tanto profesional como personal:

Muchas Gracias!!!

Índice

Consideraciones Generales.	10
Abreviaturas	11
Resumen	14
1. Introducción	17
1.1. La Fiebre Aftosa	17
1.2. Importancia económica.	17
1.3. Distribución mundial.	18
1.4. Situación en la Argentina y en la región.	19
1.5. El virus de la fiebre aftosa (VFA).	21
1.5.1. Estructura de la cápside.	21
1.5.2. Organización genómica.	23
1.5.2.1. Regiones no codificantes (UTRs).	24
1.5.2.2. Región codificante.	25
1.5.3. Ciclo de replicación.	29
1.5.3.1. Adsorción.	29
1.5.3.2. Penetración y desnudamiento.	30
1.5.3.3. Síntesis y procesamiento de proteínas virales.	31
1.5.3.4. Replicación del ARN genómico	32
1.5.3.5. Encapsidación y maduración.	33
1.5.4. La proteína no capsidal 3A.	34
1.5.4.1. La proteína 3A del VFA.	36
1.5.5. Variabilidad genética del VFA.	37
1.5.6. Patogenia del VFA.	38
1.6. Respuesta inmune contra el VFA.	39
1.6.1. Respuesta inmune humoral.	40
1.6.2. Respuesta inmune celular.	41
1.7. Diagnóstico epidemiológico.	41
1.8. Control de la Fiebre Aftosa.	42
1.8.1. Vacunación contra el VFA.	43
1.8.2. Determinación de anticuerpos contra proteínas capsidales. Control de vacunas y determinación de inmunidad poblacional.	45
1.8.3. Determinación de anticuerpos contra PNC. Detección de la circulación viral y vigilancia. Control de vacunas	45

1.8.4. Diferenciación de animales vacunados de infectados	46
1.9. El uso de la genética reversa para estudios en virología.	47
2. Objetivo General	50
2.1. Objetivos Específicos	50
2.2. Construcción de la Hipótesis de trabajo y justificación general de la metodología	52
3. Materiales y Métodos	54
3.1. Plásmidos.	54
3.2. Células.	54
3.3. Cepas bacterianas.	55
3.4. Técnicas generales de biología molecular.	55
3.4.1. Diseño de primers.	55
3.4.2. Reacción de PCR con la enzima Pfx50.	55
3.4.3. Digestión con enzimas de restricción (ERs).	55
3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.	56
3.4.5. Extracción y purificación de ADN.	56
3.4.6. Mutagénesis por PCR de solapamiento.	56
3.4.7. Ligación de moléculas de ADN	57
3.4.8. Transformación de bacterias competentes.	58
3.4.9. Minipreparaciones de ADN	58
3.4.10. Midipreparaciones de ADN con columnas.	59
3.4.11. Secuenciación de ADN	60
3.4.12. Análisis de secuencias <i>in silico</i> .	60
3.4.13. Transcripción in vitro con T7 polimerasa.	60
3.5. Construcción de los distintos plásmidos y mutantes del Sistema Replicón.	60
3.5.1. Corrección de pRep Δ G4120 para la obtención del plásmido pRep funcional	62
3.5.2. Construcción del Replicón Defectivo 1 (pRepD1).	63
3.5.3. Construcción de pRepSuperDeletado (pRepSD)	64
3.5.4. Construcción de mutantes de la proteína 3A con deleciones parciales en la región N-Terminal, en el background del plásmido pRep.	64
3.5.5. Construcción de los plásmidos con mutaciones puntuales de 3A (pRepQ18A/H19A/E20A y pRepE20A).	66

3.5.6. Construcción del plásmido con la delección de la región transmembrana de 3A (pRep Δ TM)	66
3.6. Construcción de los plásmidos utilizados en IFIs.	67
3.6.1. Construcción de los plásmidos p3AF, p Δ 6-11F, p Δ 6-17F y p Δ 6-23F.	67
3.6.2. Construcción de los plásmidos pEGFP[3A] y pEGFP[3AF]	68
3.6.3. Construcción de los plásmidos p Δ TMF.	69
3.7. Construcción de los plásmidos Clon infeccioso.	70
3.7.1. Construcción de los clones a evaluar como Clon Infeccioso.	70
3.8. Construcción de los plásmidos utilizados en el mapeo del anticuerpo monoclonal 3H7 y 3AGFP-ELISA.	71
3.8.1. Construcción de los clones delecionados del polipéptido 3ABC.	71
3.8.2. Construcción de clones que portan los péptidos N-terminales de 3A fusionados a EGFP (Δ 19-GFP, Δ 29-GFP, Δ 38-GFP) y 3A-GFP.	72
3.9. Transfección de células BHK-21 con ARN o ADN y Lipofectamina.	73
3.10. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).	74
3.11. Ensayos de medición de actividad de Luciferasa.	75
3.12. Expresión de proteínas en bacterias.	75
3.13. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	76
3.14. Tinción de proteínas con <i>Coomassie Blue</i>	77
3.15. Detección de proteínas mediante <i>Western Blot</i>	77
3.16. Purificación de cuerpos de inclusión.	77
3.17. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	78
3.18. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).	78
3.18.1. 3AGFP-ELISA	79
3.18.2. ELISA-3ABC	79
3.18.3. Sueros Bovinos Utilizados.	80
4. Resultados	82
Capítulo I: Estudios sobre la proteína 3A del Virus de la Fiebre Aftosa.	82
4.1. Puesta a punto del ensayo de replicación del ARN viral con el replicón derivado del VFA que expresa el gen reportero Luc.	82
4.1.1. Transfecciones de células BHK-21 con pRep.	82
4.1.2. Evaluación del Replicón Defectivo 1 (pRepD1).	83
4.1.3. Evaluación comparativa de la transfección de ARN o ADN.	84

4.1.4. Determinación de la concentración óptima de ADN para las transfecciones.	85
4.1.5. Uso de Luciferasa Renilla como normalizador de la Actividad Luciferasa.	86
4.1.6. Evaluación de otros plásmidos defectivos.	87
4.2. Identificación en 3A de dominios involucrados en la replicación a través de mutagénesis dirigida.	88
4.2.1. Evaluación de mutantes de la proteína 3A con deleciones parciales en la región N-Terminal.	89
4.2.2. Evaluación de mutantes en la región N-terminal de 3A.	90
4.2.3. Construcción de una mutante en la región propuesta como transmembrana de la proteína no estructural 3A.	91
4.2.4. Clivaje del factor celular eIF4G	92
4.3. Identificación de dominios de la proteína 3A involucrados en la asociación a membranas internas o al citoesqueleto celular.	93
4.3.1. Evaluación de la ubicación intracelular de 3A y sus mutantes.	94
4.3.2. Evaluación de cambios en la asociación a membranas internas de la mutante de 3A deletada en la región transmembrana.	96
4.3.3. La mutante Δ TM en contexto del sistema Replicón.	97
4.3.4. Evaluación de cambios en la asociación a membranas internas de las mutantes 3A Δ 6-23 y 3A Δ TM mediante microscopía confocal.	99
4.4. Inclusión de las mutantes de 3A en un clon infeccioso del VFA	105
Capítulo II: Utilización de la proteína 3A para la detección de anticuerpos marcadores de infección viral en bovinos	107
4.5. Diseño de un ELISA de diferenciación de animales vacunados de infectados basado en la proteína 3A-GFP (3AGFP-ELISA)	107
4.6. Análisis de sueros por 3ABC-ELISA y 3AGFP-ELISA	110
4.6.1. Obtención del valor de corte mediante Actividad Relativa.	112
4.6.2. Análisis de los sueros bovinos mediante Western Blot.	116
4.7. Mapeo del anticuerpo monoclonal 3H7	118
4.8. Reconocimiento de péptidos derivados de la proteína 3A por sueros bovinos en ensayos de ELISA	121
5. Discusión	124
5.1. Evaluación de mutantes de la proteína 3A en la región N-Terminal.	125

5.2. Evaluación de una mutante de la proteína 3A con una deleción en la región propuesta como transmembrana	128
5.3. Importancia de las regiones evaluadas de la proteína 3A.	129
5.4. Utilización de la proteína 3A para la detección de anticuerpos marcadores de infección viral en bovinos	130
6. Conclusiones	134
Anexos	136
Anexo I: Soluciones	136
AnexoII: Primers	138
AnexoIII: Anticuerpos.	139
Bibliografía	141

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa del estatus oficial de Fiebre Aftosa	19
Figura 2. Mapa del estatus sanitario actual.	20
Figura 3. Diagrama esquemático de la cápside del VFA	22
Figura 4. Organización genómica del VFA y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral	23
Figura 5. Efecto del clivaje de eIF4G.	26
Figura 6. Representación esquemática del ciclo replicativo de picornavirus	30
Figura 7. Representación esquemática de la acción de las proteasas en el procesamiento de la poliproteína del VFA.	32
Figura 8. Proteínas 3A de diferentes picornavirus	35
Figura 9. Mutagénesis por PCR de solapamiento	57
Figura 10. Replicón del VFA	61
Figura 11. Sistema Replicón.	61
Figura 12. Esquema del plásmido pRep	62
Figura 13. Esquema de la construcción de un Replicón Defectivo (pRepD1)	63
Figura 14. Esquema del plásmido pRep Super Deletado	64
Figura 15. Esquema de la proteína no capsidal 3A	65
Figura 16. Esquema del subclonado en pRep para obtener las distintas mutantes de deleción de 3A	65
Figura 17. Esquema de las mutantes puntuales de 3A	66

Figura 18. Esquema de la construcción del plásmido p3AF, a partir de pEFGP-N1	68
Figura 19. Esquema de la construcción del plásmido pEGFP[3A-F], a partir de pEFGP[3A] y p3AF	69
Figura 20. Clon de genoma completo y Replicón del VFA	71
Figura 21. Esquema de deleciones N-terminales en el ADN codificante del polipéptido 3ABC	72
Figura 22. Esquema de péptidos de 3A fusionados a EGFP	73
Figura 23. Actividad de Luciferasa de pRep en función del tiempo	83
Figura 24. Actividad de Luciferasa de luciérnaga de pRep y pRepD1, en función del tiempo.	83
Figura 25. Evaluación de actividad de Luciferasa luego de transfección con ARN o ADN	84
Figura 26. Determinación de la concentración de ADN óptima	85
Figura 27. Elección del plásmido de Luciferasa Renilla para normalizar	86
Figura 28. Ensayo de los Replicones Defectivos	88
Figura 29. Diferencia en la actividad Luciferasa de replicones portando las deleciones en la región N-terminal de 3A	89
Figura 30. Evaluación de las mutantes puntuales en las posiciones aminoacídicas 18-19-20 en el N-terminal de 3A	90
Figura 31. Actividad de Luciferasa de la mutante pRep Δ TM	91
Figura 32. Clivaje del factor eIF4G	93
Figura 33. Expresión de EGFP	94
Figura 34. Imágenes de microscopía de fluorescencia de 3Awt	95
Figura 35. Imágenes de microscopía de fluorescencia de mutantes de 3A	96
Figura 36. Análisis de células transfectadas con 3A wt y la mutante 3A Δ TM	97
Figura 37. Análisis de células transfectadas con pRep y la mutante pRep Δ TM	98
Figura 38. Localización de la proteína 3A, sus mutantes y el complejo de Golgi.	100
Figura 39. Superposición de la localización de la proteína 3A, sus mutantes y el complejo de Golgi.	101
Figura 40. Localización de la proteína 3A, sus mutantes y tubulina.	102
Figura 41. Superposición de la localización de la proteína 3A, sus mutantes y tubulina.	103
Figura 42. Localización de la proteína 3Awt, 3A Δ TM y el Complejo de Golgi en el contexto del replicón	104

Figura 43. Localización de la proteína 3A _{wt} , 3A Δ TM y tubulina en el contexto del Replicón.	105
Figura 44. Transfección con el clon de genoma completo en células BHK-21	106
Figura 45. Caracterización del antígeno 3AGFP en ensayos de Western blot	108
Figura 46. Esquemas comparativos de 3ABC-ELISA y 3AGFP-ELISA	109
Figura 47. Diluciones de sueros de referencia, evaluadas en el 3AGFP-ELISA	109
Figura 48. Análisis de sueros positivos en el 3AGFP-ELISA	110
Figura 49. Gráficos de DO de 3ABC-ELISA y 3AGFP-ELISA	112
Figura 50. AR de los sueros de referencia evaluados en 3ABC-ELISA y 3AGFP-ELISA	114
Figura 51. Perfil de inmunoreactividad de 363 sueros de bovinos vacunados no infectados con VFA	116
Figura 52. Análisis por Western blot de sueros positivos débiles	117
Figura 53. Análisis por Western blot de sueros positivos	118
Figura 54. Expresión de las proteínas 3ABC delecionadas	119
Figura 55. Análisis de la reactividad de péptidos derivados de 3A con el Ac.monoclonal 3H7	121
Figura 56. ELISA indirecto para la evaluación de péptidos N-terminales de 3A fusionados a GFP	122

Índice de Tablas

Tabla 1. Sueros de Referencia	107
Tabla 2. Péptidos sintéticos	120

Consideraciones Generales.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a una beca interna doctoral del CONICET.

El proyecto de "Desarrollo de vacunas nuevas contra la fiebre aftosa basadas en cápsides virales no infecciosas," en el marco del PID 2013- 0022 y el Programa de Áreas Estratégicas: PAE-PICT-2007-00025. "Desarrollo de vacunas de nueva generación para el virus de la fiebre aftosa utilizando vectores replicativos y no replicativos en combinación con citoquinas", ambos bajo la dirección de la Dra. Nora Mattion.

También nos brindó su apoyo económico la Fundación de Estudios en Virología Animal (FEVAN).

Abreviaturas

aa: Aminoácido.

Ac.: Anticuerpo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

AR: Actividad Relativa.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido Ribonucleico mensajero.

Background: contexto, trasfondo.

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

Buffer: Solución tamponada (mantiene constante su pH).

BSA: seroalbúmina bovina.

°C: grados centígrados.

cap: 7-metilguanosina unida covalentemente al extremo 5' del ARNm.

cre: elemento replicativo que actúa en *cis*

CO₂: Dióxido de carbono.

col.: Colaboradores.

C-terminal: carboxi terminal

DMEM: Medio esencial mínimo de Dulbecco.

dNTPs: Deoxinucleótidos.

DO: Densidad óptica.

EDTA: Ácido etilendiamidotetraacético.

EGFP: enhancer green fluor protein

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

EITB: prueba de inmunoelectrotransferencia

ER: enzima de restricción

FA: Fiebre Aftosa

fitness: Eficacia biológica.

g: gramo.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GFP: green fluor protein

h: Hora.

hs: Horas.

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

hotspots: Sitios con alta tasa de mutación o recombinación.

hpt: Horas post transfección.

IFN: interferón

IFI: Immunofluorescencia indirecta.

Ig: Inmunoglobulina.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

IPTG: Isopropil-Beta-D-Tiogalactopiranosido.

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

Kb: Kilo base.

kDa: Kilo Daltons.

l: Litro.

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

loop: Estructura secundaria del ARN en forma de bucle.

M: Molar.

mAb: Anticuerpo monoclonal.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

μl: Microlitro.

μg Microgramo.

mg: Miligramo.

ml: Mililitro.

mM: Milimolar.

min: Minuto.

Naïve: no infectados ni vacunados, sin anticuerpos contra el VFA

ng: Nanogramo.

nt: Nucleótidos.

N-terminal: amino terminal

OIE: Organización Mundial de la Salud Animal

ORF: marco de lectura abierto

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida.

PANAFTOSA: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

pb: Pares de bases.

PBS: Phosphate buffered saline: solución salina de fosfatos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PEG: Polietilenglicol.

pellet: Precipitado obtenido de la centrifugación.

pH: Potencial hidrógeno.

PKs: pseudonudos (*pseudoknots*)

PNC: proteínas no capsidales

pmol: picomoles.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

poli(A): tracto poliadenílico

poli(C): tracto policitidílico

primers: Cebadores, u oligonucleótidos iniciadores.

pRep: plásmido Replicón

pTM : zona transmembrana propuesta

PV: Poliovirus

RE: Retículo Endoplasmático

rpm: Revoluciones por minuto.

SD: Desvío estándar.

SDS: Dodecyl sulfato de sodio. Detergente aniónico.

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal.

SFB: Suero Fetal Bovino.

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

T7 pol: ARN Polimerasa ADN dependiente del Bacteriofago T7.

Ta: temperatura de *annealing* o hibridización

TA: Temperatura Ambiente.

Tm: temperatura de *melting*

UTR: Región no codificante (UnTranslated Region).

UV: Luz Ultravioleta.

Vf: Volumen final

VFA: Virus de la fiebre aftosa.

VRE-A: Virus de la Rinitis Equina-A

VRB-2: Virus de la Rinitis Bovina-2

WB: Western Blot.

wt : *wild type* o de tipo salvaje.

Resumen

La Fiebre Aftosa es una enfermedad vesicular aguda de rápida propagación y amplio rango de huéspedes. El agente etiológico es el virus de la fiebre aftosa (VFA), un virus no envuelto con genoma ARN de simple cadena y polaridad positiva, perteneciente a la familia *Picornaviridae*. El genoma del VFA codifica para una poliproteína que es escindida por proteasas virales para generar 4 proteínas capsidales y 8 no capsidales (PNC). Se ha reportado que la proteína NC 3A juega un papel relevante en la síntesis del ARN, en el anclaje a membranas intracelulares del complejo replicativo, así como en la virulencia y rango de huésped del VFA. El propósito de este trabajo fue estudiar el rol de la región N-terminal y la propuesta como transmembrana de la proteína NC 3A en la replicación del ARN y en su ubicación intracelular.

La metodología utilizada fue la evaluación de mutantes puntuales y de delección realizadas sobre un replicón del VFA (pRep), basado en la cepa O1/Campos, transcrito desde el promotor de la polimerasa del fago T7 (T7pol). Este replicón codifica la región completa de proteínas NC, y los extremos no traducibles, pero las proteínas capsidales fueron reemplazadas por el gen reportero de la Luciferasa de Luciérnaga.

Se realizaron delecciones sobre pRep en la región N-terminal de 3A (pRep Δ 6-11, pRep Δ 6-17 y pRep Δ 6-23) y posteriormente mutaciones puntuales (pQ18A/H19A/E20A y pE20A). Por otra parte, se mutó la zona predicha como transmembrana (aa 57-76), reemplazándola por una secuencia de 8 alaninas (pRep Δ TM). La evaluación de replicación/transcripción se realizó por medición de luminiscencia, luego de transfección de células BHK-21 con los plásmidos mutantes o controles, junto con los plásmidos que expresan T7pol y Luciferasa Renilla, este último para normalizar la medición. Las mutantes pRep Δ 6-23, pQ18A/H19A/E20A, pE20A y pRep Δ TM presentaron una marcada disminución de actividad Luciferasa con respecto a pRep con 3A *wt*.

La ubicación intracelular se evaluó mediante Inmunofluorescencia Indirecta, por microscopia de fluorescencia y confocal, utilizando el anticuerpo monoclonal 3H7 y un anticuerpo comercial contra la etiqueta *Flag*. Se construyeron plásmidos de expresión de 3A*wt* (p3AF) y de las mutantes analizadas anteriormente, unidas a la etiqueta *Flag* (p Δ 6-11F, p Δ 6-17F, p Δ 6-23F y p Δ TMF). Con la mutante p Δ TMF, se demostró que la secuencia comprendida entre los aa 56 y 76 de la proteína 3A del VFA, estaría involucrada en la asociación a membranas citoplasmáticas, ya que luego de su delección la proteína se localiza en el núcleo celular.

Se concluye que la región comprendida entre los aa 18 a 23 de la proteína 3A, en especial el ácido glutámico en la posición 20, serían críticos para la replicación viral, mientras que los aa 56 a 76 están involucrados en la ubicación subcelular de la misma.

Complementariamente, se mapeó el anticuerpo monoclonal 3H7 y se encontró que su epítipo se ubica en la zona N-terminal de 3A y se desarrolló un ensayo de ELISA indirecto utilizando la proteína 3A unida a un péptido carrier (3AGFP-ELISA) para *screening* de circulación viral en bovinos.

El 3AGFP-ELISA resultó rápido y específico, en la distinción de sueros de animales vacunados, de sueros de animales infectados o convalecientes. Se evaluó su performance en comparación con el ensayo 3ABC-ELISA actualmente en uso, (desarrollado también por nuestro Instituto), mediante el análisis de un grupo de 5 sueros positivos de referencia fuertes y débiles (cercaos al valor de corte del ensayo) y posteriormente el análisis de 363 sueros de animales vacunados/no infectados. Los resultados obtenidos con ambos ELISAs 3AGFP y 3ABC mostraron una muy buena correlación, por lo que 3AGFP-ELISA, se podría proponer como una técnica simple y rápida, para el *screening* inicial de sueros de campo.

Introducción

1. Introducción

1.1. La Fiebre Aftosa

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad vesicular aguda altamente contagiosa, de diseminación muy rápida. Afecta a una amplia gama de animales ungulados de pezuña hendida; tanto domésticos (bovinos, porcinos y caprinos) (Pereira, 1981) como salvajes, ya que existen más de setenta especies dentro de las veinte familias de mamíferos que han resultado susceptibles a la infección natural o experimental (Forman y cols., 1974; Sobrino F., 2004).

Los primeros registros que existen de esta enfermedad datan del siglo XVI y fueron realizados por el humanista italiano Girolamo Fracastoro, en Venecia en 1514 (Fracastoro, 1546). Tres siglos más tarde la FA fue la primera enfermedad animal asociada a un elemento filtrable (Loeffler, 1897), el que fue posteriormente denominado Virus de la Fiebre Aftosa (VFA).

1.2. Importancia económica.

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

El costo de este impacto económico negativo, puede llegar a valores exorbitantes, como ocurrió luego del brote de FA serotipo O en Gran Bretaña en el año 2001, que

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

1.3. Distribución mundial.

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

Los estudios de epidemiología molecular sugieren que Europa habría actuado como el eje central de la enfermedad desde donde se extendió al resto del mundo, produciéndose dos grandes radiaciones a finales del siglo XVII y principios del XVIII que dieron lugar a las actuales cepas circulantes Euroasiáticas y Sudafricanas (Sobrinho y cols., 2001; Tully y Fares, 2008). La FA llegó a estar muy extendida en el pasado, aunque en la actualidad, y tras la aplicación de fuertes campañas de control, se ha conseguido su erradicación en diversas zonas del planeta, y hoy se considera que la enfermedad solamente se mantiene endémica en la mayoría de los países de Asia y África. En América del Sur solamente son endémicos Surinam y Venezuela, aunque existen zonas en la Amazonia, donde el estatus de la enfermedad no está claramente definido (Figura 1).

La proximidad geográfica y la existencia de intercambios comerciales con países en los que la FA es endémica, impone un riesgo permanente de reintroducción en los países libres. De hecho, en los últimos años se han registrado numerosos brotes en países que se consideraban libres de la enfermedad, como es el ya mencionado caso de Taiwán (Dunn y Donaldson, 1997), en países de Europa, como Grecia, Rusia, y los Balcanes, (Valarcher y cols., 2008), en Japón (Sakamoto y Yoshida, 2002), en el Reino Unido (Samuel y Knowles, 2001), en la República de Corea (Pacheco y cols., 2016) y en regiones ya declaradas libres de América del Sur (Konig y cols., 2007; Mattion y cols., 2004; Malirat y cols., 2007; Maradei y cols., 2013). La información detallada y

actualizada sobre la situación actual de la FA se registra periódicamente en la página web de la Organización Mundial de Salud Animal (<http://www.oie.int>).

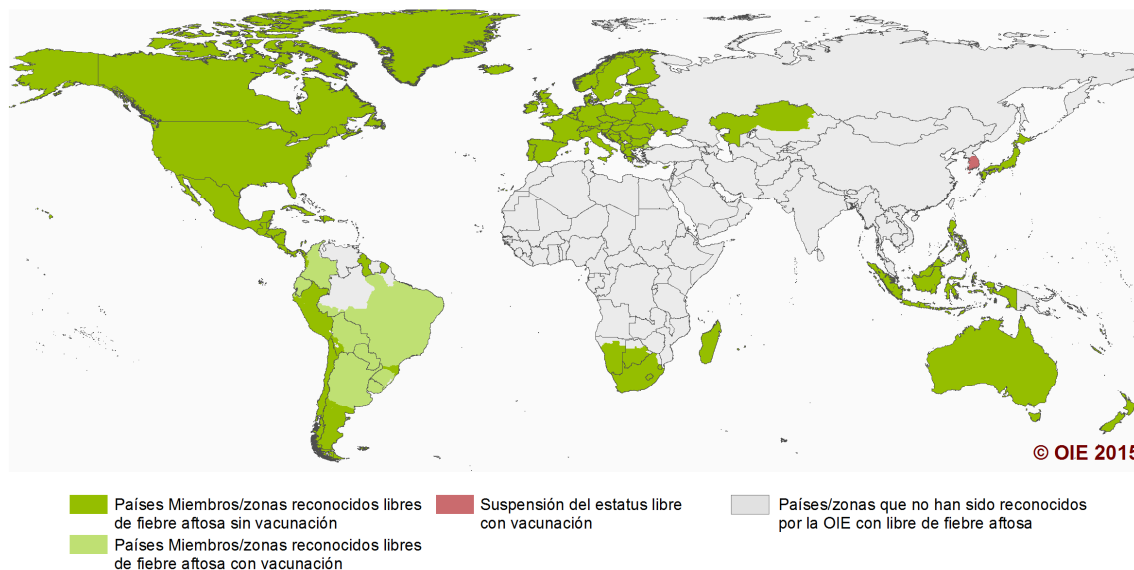


Figura 1. Mapa del estatus oficial de Fiebre Aftosa en los países miembros de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE). Última Actualización: mayo de 2015

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

1.4. Situación en Argentina y en la región.

Por el suelo, clima, densidad ganadera, dinámica de movimientos y demás propiedades de la estructura productiva, en la Argentina se pueden diferenciar varios ecosistemas con relación a la FA. El agrupamiento en dos grandes zonas sirvió de fundamento para implementar la estrategia de control y aplicación:

✓ Una zona de producción bovina de alta concentración y movilidad, que comprende el norte, centro y este del territorio (que respondía a la característica de zona endémica cuando se hallaba presente la enfermedad);

✓ Una zona al sur del Río Negro, de muy baja producción bovina, con un relieve de meseta árida de grandes extensiones, con muy baja tasa de contacto, más propicia a la producción ovina para lana, poca y dispersa población humana, que fue caracterizada

como Ecosistema Naturalmente Libre (SENASA 2016).

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



Figura 2. Mapa del estatus sanitario actual. SENASA. Última Actualización junio de 2016.

En febrero de 2011 la OIE declara “Zona libre de FA que practica la vacunación” a la zona de alta vigilancia denominada Cordon Fronterizo como reconocimiento del estatus mantenido en esa zona por las medidas aplicadas desde su creación, y la

vigilancia llevada a cabo anualmente que permite concluir que no hay circulación viral. También se reconoce el estatus de “Zona libre de FA sin vacunación” a la pequeña zona de altos valles andinos, denominada Valles de Calingasta, de la provincia San Juan. En mayo de 2014, la asamblea 82° de la OIE otorga la condición de “Zona libre de FA sin vacunación” al área comprendida entre los ríos Colorado y Negro, zona denominada Patagonia Norte A. El estatus sanitario de las 5 zonas (Figura 2) se ratifica todos los años por la OIE (OIE, 2016). Esta ratificación se fundamenta en los resultados de la vigilancia epidemiológica, que con la aplicación de muestreos serológicos y atención de denuncias y sospechas demuestra que se mantiene la condición sanitaria de libre de FA en las distintas zonas del país (SENASA, 2016).

1.5. El Virus de la Fiebre Aftosa.

El VFA es el agente causal de la FA, pertenece a la familia *Picornaviridae*, género *Aphthovirus* (Fenner, 1976).

La familia *Picornaviridae* abarca los virus de ARN pequeños y comprende familias muy importantes de patógenos humanos y del ganado. Está dividida en cinco géneros: *Enterovirus*, *Cardiovirus*, *Rhinovirus*, *Hepatovirus* y *Aphthovirus* (Cooper, 1978)

El VFA constituye la especie tipo del género *Aphthovirus* (Fauquet C., 2005), dentro del cual también se describen el Virus de la Rinitis Equina-A (VRE-A) (Li y cols., 1996) y el Virus de la Rinitis Bovina-2 (VRB-2), (Hollister y cols., 2008).

El VFA es un virus de genoma ARN de cadena simple y polaridad positiva. El virión intacto presenta un peso molecular de $8,4 \times 10^6$ Da (Strohmaier y Adam, 1976), y un coeficiente de sedimentación de 140S y su densidad en cloruro de Cesio es de (1,43-1,45 g/cm³). Las cápsides del VFA son extremadamente sensibles a las altas temperaturas y, a diferencia de lo que ocurre con otros picornavirus, también al pH ácido (Brown, 1972).

1.5.1. Estructura de la cápside.

El VFA, como todos los picornavirus, carece de envoltura lipídica. La partícula viral está compuesta por ácido ribonucleico (ARN) en un 30% y por proteína en un 70% (Burness y cols., 1973; Drzeniek y Bilello, 1974). Su cápside, de simetría icosaédrica 5:3:2 y de 27 a 28 nm de diámetro en la partícula seca (Acharya y cols., 1989), está

compuesta por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas capsidales: VP1, VP2, VP3 y VP4.

Las proteínas VP1, VP2 y VP3, con un peso molecular entre 27 y 30 kDa, comparten una estructura terciaria similar en forma de barril β , compuesta por ocho cadenas β antiparalelas conectadas entre sí por "loops" de longitud variable (Hogle y cols., 1985). La proteína VP4, formada por 85 residuos y de 10 kDa aproximadamente, adopta una estructura extendida en la superficie interior de la cápside (Boothroyd y cols., 1982; Curry y cols., 1996) y se encuentra unida covalentemente a un residuo de ácido mirístico en su extremo N-terminal (Belsham, 1992). En su interior, la cápside aloja dos copias de la polimerasa viral (denominada 3D) de 52 kDa (Newman y cols., 1994), y una copia del genoma viral.

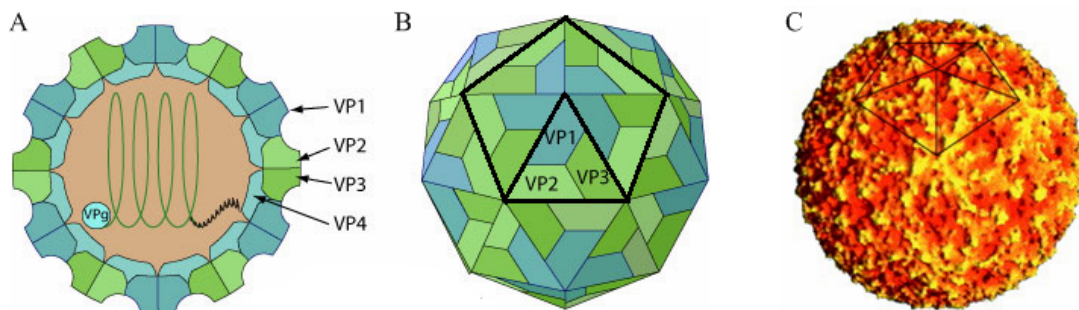


Figura 3. Diagrama esquemático de la cápside del VFA. La cápside consiste en un arreglo icosaédrico densamente empaquetado de 60 protómeros. Cada uno consiste en 4 polipéptidos, VP1, VP2, VP3 y VP4 (A y B). VP4 se localiza en el lado interno de la cápside (A). Cinco protómeros se unen para formar un pentámero (B y C) y doce pentámeros constituyen la cápside completa. (De: <http://viralzone.expasy.org/>)

Una molécula de cada una de las proteínas de la cápside, VP1, VP3 y el precursor VP0 (VP4+VP2) constituyen un protómero, que presenta un coeficiente de sedimentación de 5S. Cinco protómeros se asocian formando un pentámero, de coeficiente de sedimentación 12S, y doce pentámeros se unen para formar la cápside, de coeficiente de sedimentación 140S (Figura 3). La encapsidación del ARN ocurre tras el ensamblaje de los protómeros en pentámeros, y de los pentámeros entre sí. La incorporación del genoma de ARN desencadena un clivaje autoproteolítico en el precursor VP0, generando VP4 y VP2 maduras (Knipe y cols., 1997), lo cual es imprescindible para que ocurra la infección (Curry y cols., 1997). También es posible detectar partículas que presentan un coeficiente de sedimentación de 75S, las cuales se reconocen como cápsides vacías, y son productos naturalmente defectivos que contienen moléculas de VP1, VP3 y el precursor VP0, pero no contienen ARN viral.

1.5.2. Organización genómica.

Dentro de la estructura formada por la cápside se encuentra el genoma viral, una molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva, de aproximadamente 8,4 Kb (Bachrach, 1977), con un peso molecular de 2700 kDa y un coeficiente de sedimentación de 35S (La Torre y cols., 1980). El genoma viral está flanqueado en ambos extremos por regiones no codificantes (5' y 3' UTR, por *Untranslated Regions*), que incluyen elementos reguladores con complejas estructuras secundarias y terciarias (Carrillo y cols., 2005; Flint, 2009). Entre estas dos regiones se localiza la región codificante, con un único marco de lectura abierto (*ORF*). En el extremo 3' se observa un tracto poliadenílico o poli(A) (Chatterjee y cols., 1976; Sangar y cols., 1977), que puede variar en longitud entre 20 y 200 bases (Porter y cols., 1978). El extremo 5' se encuentra covalentemente unido a una proteína viral, VPg (*virion protein genome*), la cual juega un rol importante en la iniciación de la síntesis del ARN viral, codificada por gen 3B (Paul y cols., 1998; Ferrer-Orta y cols., 2006a). En la región 5'UTR se localiza un tracto policitidílico, o poli(C), (Rowlands y cols., 1978). La región codificante da origen a una única poliproteína que, tras ser traducida, es procesada por las proteasas virales dando lugar a las distintas proteínas capsidales: VP4, VP2, VP0, y no capsidales (PNC): L, 2A, 2B, 3A, 3B, 3C y 3D (Palmenberg, 1990) (Figura 4).

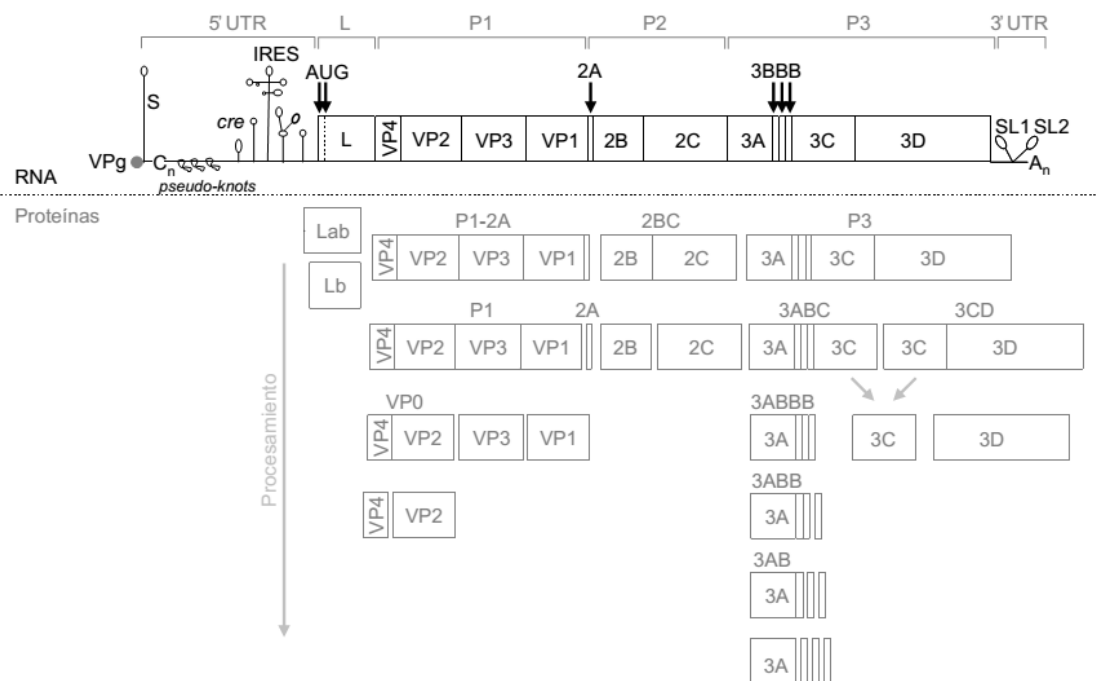


Figura 4. Organización genómica del VFA y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral. Parte superior del esquema: organización genómica de la molécula de ARN del VFA. Parte inferior del esquema: procesamiento proteolítico de la poliproteína para dar lugar a los diferentes precursores y proteínas maduras. Se indica también el sitio de autoproteólisis de 2A. (De: Ryan, 2004).

A continuación se describen en detalle la composición y estructura de las regiones no codificantes y de la región que codifica para la poliproteína viral.

1.5.2.1. Regiones no codificantes (UTRs).

La región 5' UTR de aproximadamente 1300 nt de longitud, juega un importante rol en la replicación del VFA, habiéndose identificado dentro de ella los siguientes elementos (Figura 4): fragmento S, tracto poli(C), pseudonudos, un elemento replicativo que actúa en *cis* (*cre*) y el sitio de entrada interna del ribosoma (IRES).

El fragmento S está implicado en interacciones con factores celulares y en interacciones ARN/ARN con el extremo 3' (Serrano y cols., 2006) y se postula que podría ejercer un papel en la regulación entre traducción y replicación (Escarmis y cols., 1992; Witwer y cols., 2001).

El tracto de poli(C) es una región de longitud variable (150-200 nt) (Costa Giomi y cols., 1984). Experimentos de ingeniería genética, demostraron que cierto umbral de poli(C) es requerido para recuperar virus vivo, aunque no se ha mostrado evidencia de que la longitud del tracto poli(C) esté directamente asociado con la virulencia (Zibert y cols., 1990).

Adyacentes al poli(C) se localizan de 2 a 4 estructuras terciarias repetidas denominadas pseudonudos (*pseudoknots*, PKs) (Escarmis y cols., 1995), cuya funcionalidad se desconoce.

El elemento "*cre*" (*cis-acting replication element*), se trata de una estructura altamente estable tipo *stem-loop*. Este elemento es necesario para la replicación del ARN de los picornavirus (Mason y cols., 2002), donde el *loop* del "*cre*", a través de un motivo altamente conservado en todos los picornavirus (AAACA), actúa de molde para la uridilación de la proteína VPg (3B) y es denominado *bus* (Mason y cols., 2002; Mason y cols., 2003; Nayak y cols., 2006). A su vez, el producto VPg uridilado (VPgpU o VPgpUpU) sirve de molde para la síntesis de la hebra negativa de ARN, esencial para la replicación (Paul y cols., 2003). Las estructuras virales *bus* más conocidas se encuentran en las regiones codificantes, excepto en el VFA que posee la estructura *bus* en la región el 5'UTR (Mason y cols., 2003).

La última porción del 5'UTR, es el sitio de entrada interna del ribosoma (IRES), un elemento IRES tipo II (García-Nuñez y cols., 2014), de 450 nt, una región altamente estructurada que media la síntesis de proteínas virales de manera cap-independiente (Kuhn y cols., 1990; Martínez-Salas y cols., 2002; Pelletier y Sonenberg, 1989;

Belsham y Brangwyn, 1990). El IRES del VFA posee 5 dominios y forma múltiples estructuras tipo *stem-loops*. Además, presenta un alto grado de conservación filogenética y se han identificado algunos motivos que son esenciales para mantener su actividad, así como para la interacción con algunas proteínas celulares (PTB, PCBP-2, ITAF45, eIF4G, eIF3 y eIF4B), (Martinez-Salas y cols., 2008).

En el extremo 3' del ARN se localiza la otra región no codificante (3'UTR) la cual se encuentra a continuación del codón de terminación de la poliproteína y consiste en dos componentes: una secuencia estructurada de 90 nt, plegada en dos *stem-loops* (SLs), (Mason y cols., 2003), y un tracto de poli(A) de longitud variable (Chatterjee y cols., 1976; Sangar y cols., 1977; Serrano y cols., 2006). Ambos elementos están involucrados en la replicación y la virulencia (García-Nuñez y cols., 2014). La estructura 3'UTR se une directamente con el fragmento S y el IRES en dos posiciones distintas, a través de patrones de contacto específicos ARN-ARN (Serrano y cols., 2006). El poli(A) interviene en el inicio de la síntesis de ARN de polaridad negativa, a través de los residuos de adenilato terminales que actúan como molde con el que se aparea el iniciador VpgpUpU; su eliminación afecta la infectividad del ARN viral (Saiz y cols., 2001). Asimismo interviene, a través de proteínas asociadas, en la circularización del genoma necesaria para que tenga lugar la replicación (Barton y cols., 2001; Herold y Andino, 2001).

1.5.2.2. Región codificante.

Constituye la mayor parte del genoma viral, con aproximadamente 7000 nt de longitud, y da origen a una única poliproteína de alrededor de 2330 aminoácidos, cuya traducción puede comenzar en dos codones AUG funcionales, separados entre sí por 84 nt (Beck y cols., 1983; Forss y cols., 1984). A medida que la traducción progresa, la poliproteína es procesada por proteasas virales, dando origen a 4 precursores L, P1, P2 y P3, que finalmente y tras el procesamiento completo (Figura 4) van a dar a lugar a 15 proteínas virales maduras (Palmenberg, 1990).

Las regiones L, P2 y P3 codifican precursores y PNC, mientras que la región P1 codifica las proteínas capsidales del virión:

L_{pro}: esta región codifica a la proteasa leader (L), la cual presenta dos formas alternativas, Lab o Lb, dependiendo del codón de iniciación utilizado (AUG1 o AUG2, respectivamente), (Beck y cols., 1983; Forss y cols., 1984). La proteasa L pertenece al grupo de la papaína (Guarne y cols., 1998) y se encuentra presente únicamente en los

géneros *Aphthovirus* y *Erbovirus*. La proteína L es un importante determinante de virulencia, no es requerida para la replicación viral, pero es indispensable para la patogénesis del virus (Gao y cols., 2016). Cataliza su propia escisión del resto de la poliproteína viral P1-P2-P3 e inicia la proteólisis del factor de iniciación de la traducción eIF4G (Figura 5), dependiente de cap (Strebel y Beck, 1986; Medina y cols., 1993; Steinberger y Skern, 2014). L también, bloquea directa e indirectamente la actividad de interferón tipo I y III (IFN), incluyendo sus ARNm y proteínas, por inhibición del factor regulador central río arriba (IRF-3/7), (Wang y cols., 2011). Su inhibición suprime la expresión de IFN-I, citoquinas río abajo, incluyendo IFN α/β y CCL5 (Wang y cols., 2010; Wang y cols., 2011). Recientemente, se halló que Lb, es una nueva enzima viral de ubiquitinación o deubiquitinación, que constituyen una clase importante de patrones de regulación y están involucrados en muchas señales de cascada críticas, incluyendo señalización de IFN tipo I inducida por virus (Wang y cols., 2011).

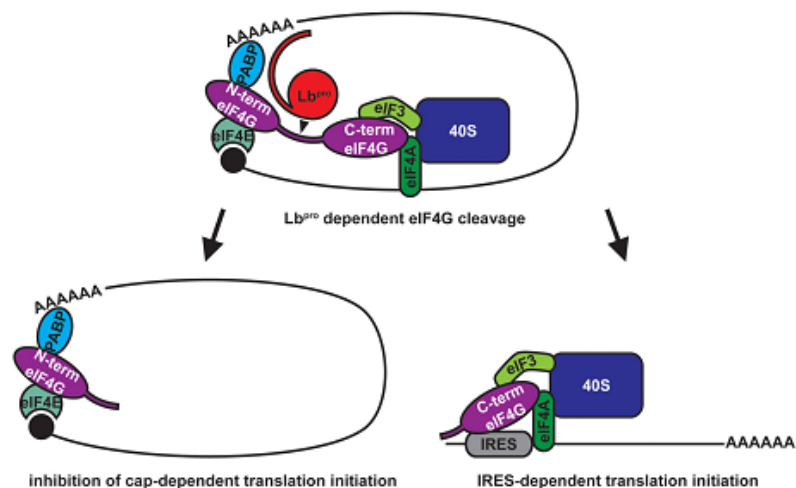


Figura 5. Efecto del clivaje de eIF4G. El clivaje de eIF4G por la proteasa L provoca que el ARNm capeado no pueda ser conectado por la subunidad 40S del ribosoma y no puede ser traducido. En contraste, el ARN viral puede unirse al fragmento C-terminal del eIF4G y así a la subunidad 40S vía eIF3 (Steinberger y Skern, 2014).

Región P1: La región P1, codifica para las cuatro proteínas capsidales cuyos genes se denominan: 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) y 1D (VP1). Las proteínas capsidales VP0 (precursor de VP4 y VP2), VP3 y VP1 integrarán la cápside viral (Racaniello, 2007).

Región P2: Esta región codifica para tres PNC maduras, llamadas, 2A, 2B y 2C, involucradas en la replicación. El procesamiento de la proteína 2A ocurre junto con el precursor P1-2A.

La proteína 2A, un péptido de solo 18 aa de longitud (más corta que la de otros miembros del género Picornavirus), se consideraba una proteasa, pero ahora se sabe que es responsable de liberar el precursor P1-2A de 2BC-P3 mediante un mecanismo de modificación de la maquinaria traducción (de Felipe y cols., 2003; Ryan, 2004).

La proteína 2B en picornaviruses una viroporina, una clase de proteínas transmembranas hidrofóbicas de bajo peso molecular, codificadas por virus animales de amplio rango de huésped. El dominio hidrofóbico transmembrana interactúa con la bicapa fosfolipídica para inducir dispersión incrementando la permeabilidad de membrana y promoviendo la liberación de partículas virales. Las viroporinas son cruciales para la patogenicidad (Ao y cols., 2014; Nieva y cols., 2012). El conocimiento sobre la proteína 2B del VFA es limitado, es un péptido de 154 aa, de longitud, levemente más larga que otras viroporinas y contiene dos dominios predictos como transmembranas. Topológicamente es localizada en el RE, y es similar a viroporinas de clase IIB (Ao y cols., 2015). La proteína 2B del VFA induce daño en la integridad de la membrana de la célula huésped y causa anomalías de iones Ca^{+2} , activando la autofagia (Ao y cols., 2015). Se ha reportado que 2B funciona sinérgicamente con otras proteínas virales. Por ejemplo, ha sido asociada en VFA al bloqueo de secreción de proteínas cuando se co-expresa con 2C (Moffat y cols., 2007) pero no por sí sola (de Jong y cols., 2008). Las viroporinas participan en múltiples estados del ciclo viral, tales como la entrada y la replicación del genoma (Gao y cols., 2016).

La proteína 2C (318 aa) es una de las moléculas más conservadas del VFA, y contiene una hélice anfipática teórica en su región N-terminal (Teterina y cols., 2006). Es responsable de funciones biológicas ligadas a blancos en membranas, aunque las investigaciones en 2C del VFA son limitadas. Se especula que 2C es un importante regulador, interactuando con múltiples señales celulares durante la infección del VFA, incluyendo apoptosis (recluta Nmi), (Zheng y cols., 2014), respuesta inmune (IFP35), (Zheng y cols., 2014) y autofagia (Beclin1), (O'Donnell y cols., 2011). 2C recluta a las proteínas Nmi (*STAT interacting*) y IFP35 (proteína inductora de INF de 35kDa) dentro de estructuras membranosas intracelulares, cambiando su distribución subcelular, formando el complejo 2C-Nmi-IFP35. También 2C está involucrada en la autofagia, y en el aumento de la replicación viral (O'Donnell y cols., 2011).

Región P3: La región P3 codifica las PNC 3A, tres copias distintas de 3B (VPg), la proteasa 3C, y la polimerasa viral (3D), que es una ARN polimerasa dependiente de ARN.

La proteína 3A del VFA, tiene 153 aa y es más larga que en otros picornavirus (Mason y cols., 2003). Posee un dominio hidrofílico y un dominio hidrofóbico, es capaz de unirse a membranas y posee regiones altamente conservadas en todas las cepas del VFA (Knowles y cols., 2001). En contraste, muchas mutaciones y deleciones ocurren en el dominio C-terminal. La proteína 3A participa en la síntesis del ARN viral (Gromeier y cols., 1999; Takeda y cols., 1986), y en el anclaje a membranas, (Xiang y cols., 1998), inhibe la secreción de proteínas celulares (Doedens y Kirkegaard, 1995) y está implicada en replicación del ARN viral (Takeda y cols., 1986; Gromeier y cols., 1999).

En el genoma del VFA existen tres copias no idénticas en tándem del gen 3B (3B₁, 3B₂ y 3B₃), que codifican para la proteína VPg (23-24 aa), (Pacheco y cols., 2003). Vpg es uridilada y se une covalentemente al extremo 5' del ARN genómico del virus, y está implicada en la iniciación de la síntesis del ARN y probablemente también en la encapsidación (Rowlands, 1999). Se ha demostrado que virus con alguna copia de 3B deletada tienen afectada la capacidad de sintetizar ARN cuando se multiplican en cultivo celular, siendo 3B₃ la que más afecta la replicación (Falk y cols., 1992; Nayak, y cols., 2005), sugiriendo que hay una fuerte presión selectiva hacia mantener esta redundancia (Pacheco y cols., 2003). La uridilación de VPg en picornavirus es necesaria para iniciar la síntesis del ARN viral (Gerber y cols., 2001; Paul y cols., 2000). El proceso de uridilación en aftovirus es estrictamente dependiente de la presencia del precursor viral 3CD, del *cre* y de 3D, e independiente del tracto de poli(A), (Nayak y cols., 2005; Nayak y cols., 2006).

La proteasa 3C es una serina proteasa de la familia de la tripsina (Gorbalenya y Koonin, 1989), produce la ruptura primaria de la unión entre 2C y 3A en las etapas iniciales de la traducción y posteriormente realiza la proteólisis de los distintos precursores proteicos virales que dan lugar a las proteínas de la cápside (excepto la ruptura entre VP4 y VP2 que tiene lugar en la etapa de encapsidación del ARN), y a las diferentes PNCs. Esta proteína es la principal proteasa viral (Argos y cols., 1984; Bazan y Fletterick, 1988) pero también es la responsable de la proteólisis de algunas proteínas celulares, como la histona H3 (Falk y cols., 1990) o los factores del inicio de la traducción eIF4A y eIF4GI (Belsham y cols., 2000).

La ARN polimerasa 3D (3Dpol) sintetiza tanto la hebra positiva como negativa del genoma y juega un rol importante, no solo en el ciclo de vida de virus ARN, sino también en su potencial adaptativo (Ferrer-Orta y cols., 2015). Está altamente conservada entre los diferentes serotipos y subtipos del VFA (George y cols., 2001). Los picornavirus usan un precursor 3CD como un intermediario funcional en la replicación viral, aunque contiene un componente 3C activo, 3Dpol permanece inactiva hasta que el procesamiento proteico es completo (Ferrer-Orta y cols., 2006b). La replicación en picornavirus es iniciada de manera *primer* dependiente. La proteína primer VPg provee el hidroxilo nucleófilo y forma un complejo con 3Dpol o 3CD (complejo de uridilización). Diferentes sitios de unión a Vpg fueron encontrados en diferentes familias virales (Ferrer-Orta y cols., 2015). En el VFA, Vpg se une al sitio activo de la 3Dpol donde se cataliza la reacción de uridilización para dar comienzo a la síntesis del ARN (Ferrer-Orta y cols., 2006a; Nayak y cols., 2005). La estructura tridimensional de la 3D del VFA ha sido experimentalmente determinada (Ferrer-Orta y cols., 2004), el sitio activo se observó mediante estructuras cristalinas de los complejos 3D-VPg y diferentes estados de la incorporación de nucleótidos durante la elongación (Ferrer-Orta y cols., 2009).

1.5.3. Ciclo de replicación.

En la Figura 6 se esquematiza el ciclo de replicación de los picornavirus, que se explicará en los próximos ítems.

1.5.3.1. Adsorción

El reconocimiento de las células blanco por el VFA ocurre a través del triplete de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp), ubicado en el *loop* GH de la proteína VP1, que se une a una serie de integrinas, como $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 6$ y $\alpha\beta 8$, que actúan como receptores celulares (Jackson y cols., 2004; Jackson y cols., 2000; Jackson y cols., 2002; Baranowski y cols., 2003; Burman y cols., 2006). Se estima que la integrina $\alpha\beta 6$ sería la más importante como receptor (Dicara y cols., 2008), y se expresa en bovinos y ovinos en células epiteliales susceptibles a la infección por VFA (Brown y cols., 2006; Monaghan y cols., 2005).

Se han descrito otros receptores, como heparán sulfato (Baranowski y cols., 2000; Jackson y cols., 1996), así como también variantes virales capaces de utilizar

como receptor moléculas diferentes de heparán sulfato o integrinas (Baranowski y cols., 1998; Sa-Carvalho y cols., 1997), (Figura 6).

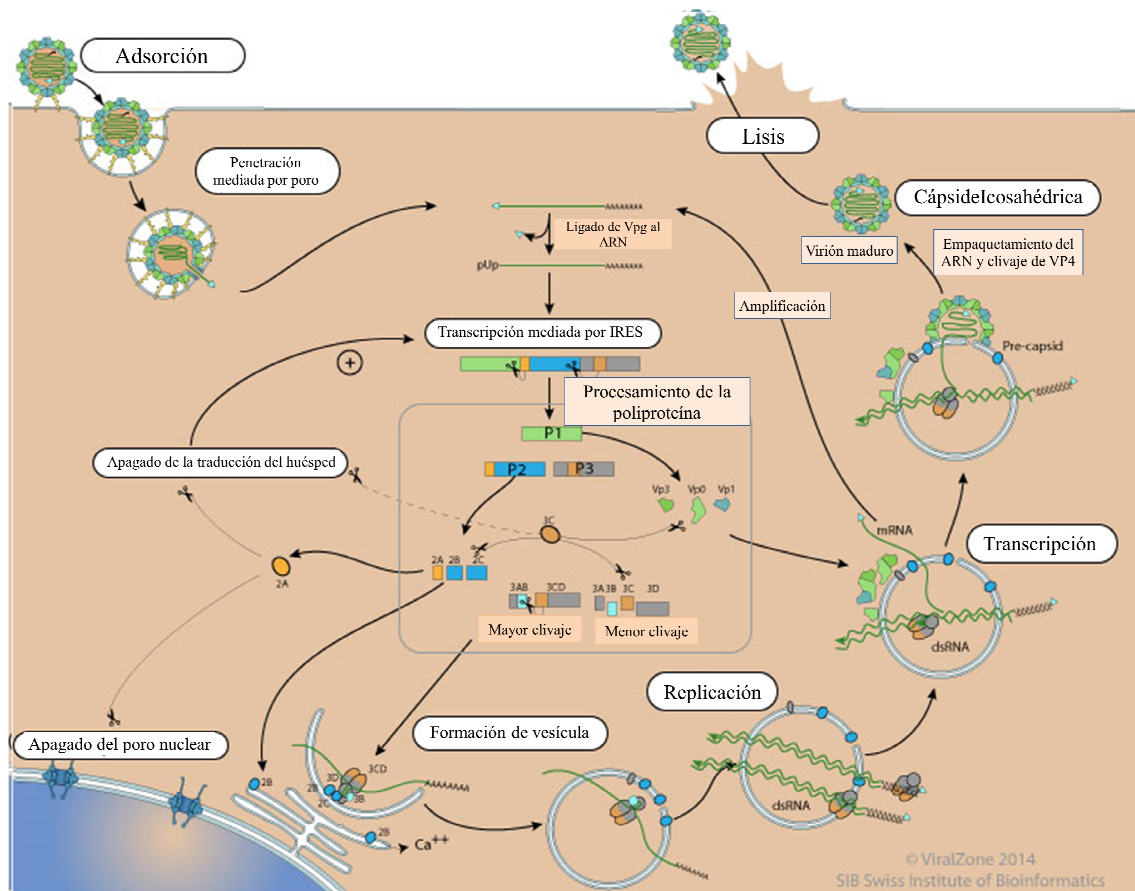


Figura 6. Representación esquemática del ciclo replicativo de picornavirus. (De: <http://viralzone.expasy.org/>)

1.5.3.2. Penetración y desnudamiento

Tras su unión a integrinas, el virión es introducido en la célula mediante un mecanismo dependiente de clatrina (Berryman y cols., 2005; Martín-Acebes y cols., 2009), en un compartimento endosomal ácido. Aquí se produce el desensamblado de la cápside en pentámeros, liberando VP4 (Vasquez y cols., 1979), por la acción de fuerzas electrostáticas que generan la protonación de residuos de histidina en la proteína VP3. La repulsión generada entre los pentámeros ayuda a su disociación, con la consiguiente liberación del ARN viral en el citosol (Ellard y cols., 1999). Este proceso parece estar inducido por acidificación en los endosomas (Carrillo y cols., 1984; Baxt 1987). La sensibilidad del virión de VFA a condiciones ácidas podría ser producto de una selección evolutiva para permitir la disociación de la cápside y la liberación del ARN

genómico durante estas etapas iniciales de la infección (van Vlijmen y cols., 1998) (Figura 6).

1.5.3.3. Síntesis y procesamiento de proteínas virales.

El ARN se libera al citoplasma, unido covalentemente a la proteína VPg (Curry y cols., 1995; Ellard y cols., 1999), la cual es rápidamente removida en la célula infectada y se considera que no participa en la iniciación de la traducción (Lin y cols., 2009).

El ARN genómico de los virus de la familia Picornaviridae es infeccioso (Belsham y Bostock, 1988), por lo que no requiere de las proteínas virales para iniciar el ciclo replicativo, que ocurre a nivel citoplasmático (Figura 6). La traducción del genoma del VFA es independiente de la estructura *cap* (7-metil-G) y se realiza a partir del sitio IRES que es capaz de unirse al ribosoma (Belsham, 1992). Requiere de todos los factores celulares para iniciación de la transcripción, excepto del eIF4E, el cual es una proteína de unión a *cap* (Belsham, 2005; Sonenberg y Hinnebusch, 2009), (Figura 5). El clivaje del eIF4G por Lpro, remueve la porción N-terminal del mismo, la cual contiene el sitio de unión para eIF4E, afectando la síntesis de proteínas *cap* dependientes, mientras que la porción C-terminal del factor eIF4G es suficiente para la actividad IRES dependiente (Steinberger y Skern, 2014). Esto contribuye a una reducción drástica de la síntesis de proteínas celulares (*shut-off*) en las células infectadas (Devaney y cols., 1988; Medina y cols., 1993; Steinberger y Skern, 2014). Adicionalmente, otras proteínas celulares están involucradas en la expresión (estimulación o represión), llamadas factores de transactivación IRES ("*IRES-transacting factors*"- ITAF), los que incluyen PTB, PCBP2, factor de *splicing* SR (SRp20), FBP2 y Gemin5, entre otros (Lozano y Martinez-Salas, 2015).

El auto clivaje de L, libera el extremo N-terminal del precursor P1-2A, cuyo extremo C-terminal se produce por auto catálisis de la proteína 2A. Más tarde la acción de 3C o 3CD sobre este precursor escinde la proteína 2A de P1 para dar lugar a las proteínas capsidales (Racaniello, 2007).

La proteasa viral 3C es la encargada de procesar el precursor 2BC para dar lugar a las proteínas 2B y 2Cy del precursor P3, liberando las proteínas 3A, 3B (VPg), 3D y su autocatálisis (Porter, 1993), (Figura 7).

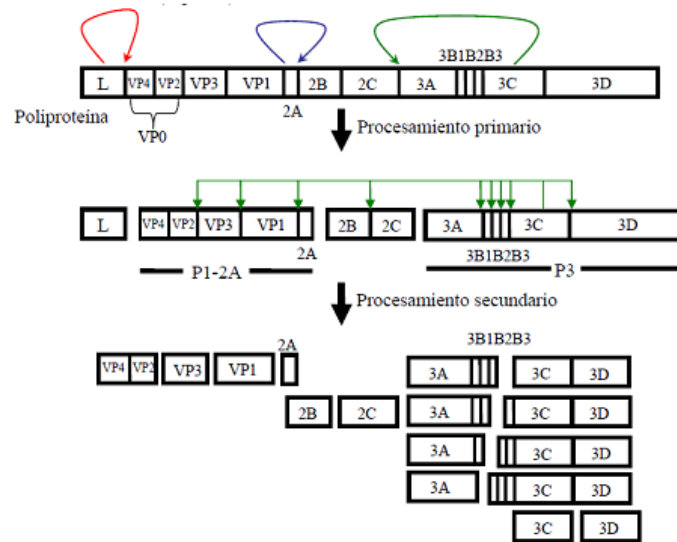


Figura 7. Representación esquemática de la acción de las proteasas en el procesamiento de la poliproteína del VFA. Se producen tres procesamientos *in cis* a medida que se sintetiza la poliproteína. La separación entre L y P1-2A se produce por el corte de L sobre sí misma (flecha roja). El corte entre P1- 2A y 2BC se produce por autocatálisis de 2A (flecha azul). El corte entre 2BC y P3 lo realiza 3C, que posteriormente ejecuta las escisiones de las demás proteínas maduras a partir de sus precursores (flechas verdes). (De: Ryan, 2004).

Las proteasas virales clivan además otras proteínas de la célula infectada que participan en procesos necesarios para la viabilidad celular, como factores de transcripción (eIF4G), histonas (H3), proteínas implicadas en el tráfico de membranas, reguladores del ciclo celular (ciclina A y ciclina B2) y que participan en la respuesta innata, entre otros (Ryan, 2004; de Los Santos y cols., 2007; Steinberger y Skern, 2014).

Estas reorganizaciones incluyen la proliferación de vesículas citoplasmáticas, las cuales, podrían provenir del RE y/o complejo de Golgi. Estudios recientes proponen la inducción de autofagosomas muy tempranamente en la infección viral, formando las vesículas de replicación (Knox y cols., 2005; Monaghan y cols., 2004; Berryman y cols., 2012).

1.5.3.4. Replicación del ARN genómico

La información relativa al mecanismo de replicación del ARN del VFA es escasa, y en general se infiere de lo que se conoce sobre poliovirus (PV). El ARN se copia por la acción de 3Dpol (Polatnick and Arlinghaus 1967; Martínez-Salas y cols., 1985; Ferrer-Orta y cols., 2004; Ferrer-Orta y cols., 2006a), la que presenta baja fidelidad debido a la ausencia de actividad correctora (o *proofreading*), que explica la gran

variabilidad genética observada en el VFA (Domingo y cols., 2002; Haydon y cols., 2001). La proteína 3Dpol sintetiza tanto la cadena positiva como la negativa del ARN viral y cataliza también la uridilación del péptido Vpg, para que éste actúe como iniciador de la síntesis de ARN de polaridad positiva. La replicación del genoma en picornavirus está asociada a la cara citoplasmática de la membrana del RE del aparato de Golgi (Barco y Carrasco 1995; Teterina y cols., 1997; Bolten y cols., 1998).

El precursor 3AB actúa en el reclutamiento de 3Dpol y del precursor 3CD hacia la membrana (Paul, 2002). Este último facilitaría la unión de 3Dpol al ARN viral a través de distintos dominios de la proteína 3C (Harris y cols., 1994). La proteína 3A también participa en la síntesis del ARN viral (Gromeier y cols., 1999; Takeda y cols., 1986), y en el anclaje a membranas, (Xiang y cols., 1998). El modelo propuesto para representar el proceso supone un tapiz de moléculas de polimerasa 3Dpol recubriendo la membrana externa del RE, formando una malla catalítica (Lyle y cols., 2002). La mayoría de las PNC y el ARN también participarían de esta estructura, llamada "complejo de replicación" (Parsley y cols., 1997; Echeverri y Dasgupta, 1995; Paul y cols., 1994), que localiza en la misma estructura celular a todos los componentes necesarios para la replicación del ARN viral (Bienz y cols., 1992).

El mecanismo de uridilación difiere en función de la polaridad del ARN a sintetizar. Para la síntesis de ARN negativo la uridilación sería mediada por el poli(A) (Murray y Barton, 2003; Paul y cols., 2003), mientras que la uridilación que utiliza como molde la estructura del *cre*, solo sería necesaria en la síntesis de ARN positivo (Murray y Barton, 2003). Sin embargo, otros autores han relacionado la uridilación de Vpg mediada por *cre* a la síntesis de ARN de ambas polaridades (van Ooij y cols., 2006). El proceso de uridilación es estimulado por el precursor 3CD (Paul y cols., 2000; Paul y cols., 2003). Debido a este mecanismo, en el interior de la célula infectada se acumula mayor cantidad de moléculas de ARN positivas que de ARN negativas. Para que comience la síntesis de la cadena negativa de ARN es necesario que cese la traducción de la molécula de ARN (Gamarnik y Andino, 1998), (Figura 6).

1.5.3.5. Encapsidación y maduración.

El ciclo de replicación finaliza con los procesos de encapsidación de la molécula de ARN genómico y de la maduración de la cápside, mediante el clivaje del precursor VP0, dando lugar a las proteínas VP4 y VP2. Se ha postulado, para PV, que únicamente las moléculas de ARN positivo que poseen una señal de empaquetamiento en *cis* y se

encuentran unidas a la proteína VPg son encapsidadas (Nomoto y cols., 1977; Novak y Kirkegaard, 1991).

Los diferentes modelos que se postulan para explicar el ensamblaje de los nuevos viriones, ya fuera por formación de cápsides vacías dónde luego entraría el ARN, o por estructuración de los pentámeros con el ARN para formar el pro-virión (revisado en Grubman y Baxt, 2004), coinciden en apuntar la necesidad de la maduración de VP0 en VP4 y VP2, una vez ensamblada la cápside (Arnold y cols., 1987; Knipe y cols., 1997). El clivaje de VP0 es autocatalítico y es esencial para la formación de virus infectivo; cuando ese proceso de maduración no se completa, no se realiza la liberación del ARN al citoplasma celular (Knipe y cols., 1997).

Otra modificación descrita es la miristilación del extremo amino del precursor VP0, que actuaría en la localización del precursor en las membranas celulares, donde tiene lugar la replicación del ARN viral así como en el correcto procesamiento y ensamblaje de las subunidades de la cápside (Chow y cols., 1987) (Figura 6).

1.5.4. La proteína no capsidal 3A.

Como se mencionó anteriormente, la proteína 3A participa en la síntesis del ARN viral (Gromeier y cols., 1999; Takeda y cols., 1986), y en el anclaje a membranas, alterando su permeabilidad (Xiang y cols., 1998), e inhibe la secreción de proteínas celulares (Doedens y Kirkegaard, 1995). Se ha demostrado que deleciones o alteraciones en la secuencia de 3A pueden afectar a la virulencia del VFA y la patogenia del virus (Giraud y cols., 1990; Beard y Mason, 2000) o contribuir a la expansión del rango de hospedador (Nuñez y cols., 2001).

La proteína 3A del VFA es considerablemente distinta en tamaño y secuencia a la del resto de picornavirus. Las proteínas 3A de los Aphtovirus VRE-A y VRB-2, aunque presentan un bajo nivel de homología (16 % y 11 %, respectivamente), son las que tienen mayor similitud con la proteína 3A del VFA (Li y cols., 1996; Hollister y cols., 2008). El análisis de sus secuencias muestra también diferencias en la localización de la región hidrofóbica correspondiente al dominio propuesto como transmembrana, definiendo en cada caso regiones amino y carboxi terminales de tamaños diferentes (Figura 8) (Tesis doctoral, Postigo Fernandez, 2009).

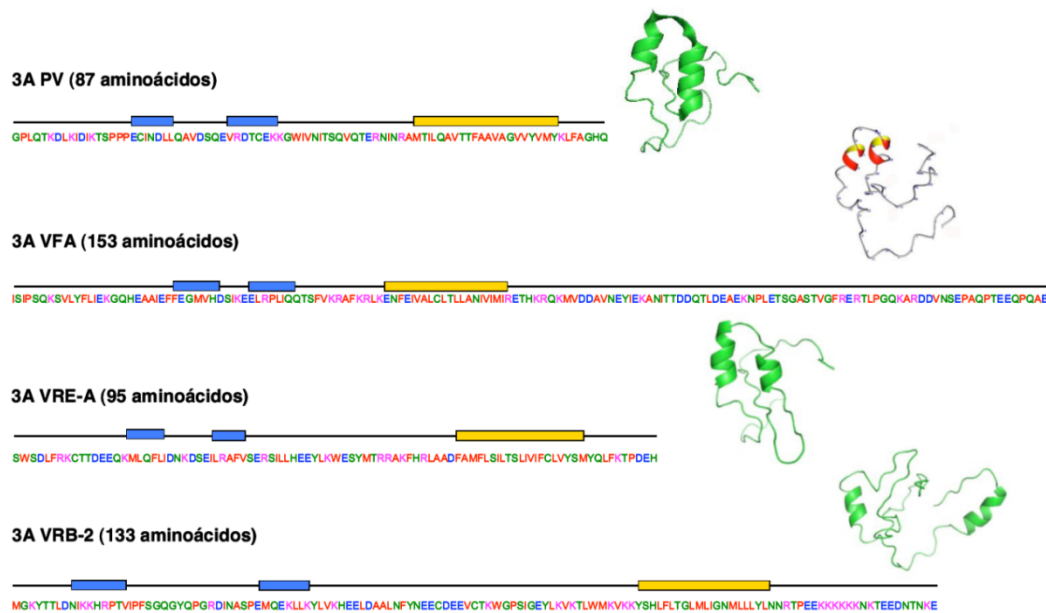


Figura 8. Proteínas 3A de diferentes picornavirus. Sobre cada una de las secuencias se indica la posición del dominio transmembrana predicho (recuadro naranja), así como las estructuras de α -hélice teóricas (recuadros azules). A la derecha de cada secuencia, se representa la estructura terciaria del dominio amino terminal de cada proteína, que se extiende hasta el inicio del dominio transmembrana. Los aminoácidos se representan en distintos colores en función de sus características físico-químicas: verde, polar sin carga; rojo, apolar; azul, polar con carga negativa; rosa, polar con carga positiva. (De: Postigo Fernandez, 2009).

Se ha podido determinar la estructura tridimensional de la porción amino terminal de 3A de PV mediante espectroscopía RMN (Strauss y cols., 2003), observándose que forma un homodímero simétrico. Este dímero se produce por la interacción intermolecular de las zonas hidrofóbicas presentes en los dos dominios de α -hélice que se predicen en la porción N-terminal de 3A.

Los restantes residuos de esta región no parecen tener una estructura definida, aunque deleciones y mutantes puntuales en su extremo N-terminal de 3A de PV afectan diversas funciones, como la inhibición del tráfico de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi, o la estimulación de la actividad proteasa de la proteína 3CD (Xiang y cols., 1995; Doedens y cols., 1997). Esto sugiere que las regiones donde se localizan estos residuos pueden adoptar, en determinadas condiciones, una conformación específica para la realización de esas funciones (Strauss y cols., 2003).

A continuación de la porción N-terminal, la proteína 3A de PV posee un dominio hidrofóbico transmembrana responsable de su unión a estructuras membranosas celulares. Este dominio, junto con las interacciones que establece con otras proteínas virales, contribuye a localizar el complejo de replicación en la superficie de las vesículas membranosas que proliferan en las células infectadas (Bienz y cols., 1987;

Semler y cols., 1982). Por ejemplo, se ha propuesto que el precursor 3AB sería el responsable de aportar la proteína Vpg (3B) al complejo de replicación (Andino y cols., 1993; Lyle y cols., 2002).

Otra de las funciones que se han descrito para la proteína 3A de PV es la inhibición de la secreción proteica en células infectadas; la inhibición de la exportación de moléculas de MHC de clase I constituye uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedador (Choe y cols., 2005; Deitz y cols., 2000; Doedens y cols., 1997). Esta inhibición afecta al tráfico de vesículas membranosas entre el RE y el aparato de Golgi (Wessels y cols., 2006; Belov y cols., 2008). Sin embargo, en el VFA el precursor 2BC pero no 3A, bloquea el envío de proteínas a la superficie celular (Moffat y cols., 2005).

1.5.4.1. La proteína 3A del VFA

Existen pocos datos directos disponibles, pero se ha observado que no todas las funciones que 3A tiene en PV son compartidas por la proteína 3A del VFA, lo que hace particularmente relevante su estudio.

Como se ha comentado, la proteína 3A del VFA es de tamaño considerablemente mayor que el del resto de picornavirus (143 a 153 aa, dependiendo del serotipo) y contiene, según se esquematiza en la Figura 8, un dominio hidrofóbico de 28 aa (residuos 59-76) al que llamaremos "propuesta transmembrana" (pTM), (Forssy cols., 1984), que se postula como el responsable de su unión a membranas en células infectadas (Forss y cols., 1984; Moffat y cols., 2005).

El dominio hidrofóbico de 3A divide la proteína en una región N-terminal que tiene mayor similitud a la de otros picornavirus, y otra C-terminal de mayor longitud (Figura 8). Sobre el N-terminal, presenta un dominio de dimerización con una interfase hidrofóbica (residuos 25 a 44), (Gonzalez-Magaldi y cols., 2012).

La primera evidencia de la relación entre la proteína 3A y la virulencia del VFA se obtuvo al analizar virus atenuados por pasajes en huevos embrionados. Los virus seleccionados poseían una proteína 3A de tamaño inferior al normal (Giraud y cols., 1987), debido a deleciones en su extremo C-terminal de 19 o 20 aa (Giraud y cols., 1990). Estas mutantes exhiben reducida virulencia en ganado bovino y fueron usadas para el desarrollo de las primeras vacunas (Beard y Mason, 2000; Giraud y cols., 1990).

Dos tipos de mutantes de delección natural fueron reportados en el C-terminal: una delección de 10 aa en la posición 93-102 y una delección de 11 aa en la posición 133-143 (Beard y Mason, 2000; Pacheco y cols., 2013). Esta última fue observada en aislamientos de ganado bovino (O/VIT/2/97 133-143) y porcino y no afecta el rango de huésped y virulencia del VFA (Knowles y cols., 2001). Por otro lado, la delección 93-102 en 3A está asociada con gran virulencia en ganado porcino (O/VIT/3/97 93-102). También se ha descrito en una variante del serotipo O aislada en Taiwán en 1997 (O/TAW/97 93-102) con la misma delección que afectó severamente a cerdos pero no se propagó en ganado bovino (Beard y Mason, 2000; Pacheco y cols., 2013; Giraudo y cols., 1990) y presentó también reducción de eficiencia de replicación viral en células bovinas pero no en células porcinas (Ma y cols., 2014).

Marcajes de fluorescencia revelan que 3A en células infectadas colocaliza parcialmente con el marcador de RE calreticulina y con la proteína p58 en Golgi (Garcia-Briones y cols., 2006). Tras su expresión transiente, 3A se localiza en pequeñas vesículas citoplasmáticas (O'Donnell y cols., 2001; Garcia-Briones y cols., 2006), y se observa que la asociación a membranas es parcial, se encuentra distribuida de manera similar entre las fracciones de membranas soluble (60%) e insoluble (40%) (Moffat y cols., 2005; Gonzalez-Magaldi y cols., 2014). Este patrón de distribución varía hacia otro más fibrilar con la adición de sucesivas copias de 3B (Vpg) al expresarse como 3AB, 3ABB y 3ABBB (Garcia-Briones y cols., 2006), lo que sugiere que el número de copias de 3B condiciona la localización subcelular de estos precursores.

Rosas y colaboradores (Rosas y cols., 2008) generaron líneas celulares BHK-21 con expresión estable de 3A y su precursor 3AB y hallaron que el nivel de expresión de 3A ejerce grados variables de toxicidad celular, pero no inducen rearrreglos de membranas celulares (Rosas y cols., 2008; Garcia-Briones y cols., 2006; O'Donnell y cols., 2001).

1.5.5. Variabilidad genética del VFA.

El VFA, como la mayoría de los virus de genoma a ARN, se caracteriza por presentar una alta variabilidad genética (Domingo y cols., 2003), que se origina principalmente en la ausencia de actividad correctora de la ARN polimerasa dependiente de ARN. La tasa de mutación de los virus a ARN, calculada a partir del número total de sustituciones de nucleótidos por el número total de nucleótidos en el genoma por ronda de replicación, está en el rango de 10^{-3} a 10^{-4} (Weissman, 1989).

Esta alta variabilidad genera poblaciones de VFA que han sido definidas como distribuciones dinámicas complejas de mutantes relacionados entre sí, a las cuales se las denomina cuasiespecies (revisión en Domingo y cols., 2006). En esas poblaciones de cuasiespecies existe un equilibrio que no es sencillo entre la alta tasa de mutación inherente a la replicación del ARN y una continua competición entre las mutantes, que resulta en la mayor adaptabilidad de aquellos con más eficacia biológica o *fitness* frente a las diferentes presiones selectivas del ambiente. Se encuentran en la literatura, trabajos que reportan la existencia de poblaciones genéticamente heterogéneas durante un brote (Piccone y cols., 1988; Malirat y cols., 2007). Además de este tipo de mutaciones que llevan a un *drift* antigénico, hay estudios (Heath y cols., 2006) que evidencian la ocurrencia de recombinaciones en *hotspots* en los extremos 3' y 5' de las regiones de P1.

Existen 7 serotipos del VFA reconocidos a nivel mundial. Los serotipos A, O y C han afectado a Sudamérica, Europa, Asia y África. Los serotipos SAT1, SAT2 y SAT3 se localizan dentro del continente africano, y el serotipo Asia1 se encuentra distribuido en el continente asiático. Debido a las diferencias en las propiedades antigénicas e inmunológicas entre los distintos serotipos, los animales recuperados de la infección causada por un serotipo viral o vacunados contra un serotipo son susceptibles a la infección por un VFA perteneciente a otro serotipo. Más de 65 subtipos virales con diferentes grados de relación serológica (Pereira, 1976) y múltiples variantes antigénicas (Mateu y cols., 1988) han sido identificados.

1.5.6. Patogenia del VFA

El período de incubación de la FA en bovinos es de 2 a 14 días (OIE, 2016), caracterizado por dos fases distintas:

- ✓ La *fase eclipse*, en la cual el virus generalmente no es localizado; puede durar pocas horas.
- ✓ La *fase prodrómica*, es la fase virémica; los animales presentan síntomas inespecíficos (fiebre, anorexia, etc) que anteceden a la aparición de las lesiones típicas. Los animales eliminan virus por sus secreciones y excreciones. Esta fase puede durar entre 2 y 10 días.

La primera fase de replicación viral ocurre en las células epiteliales del tracto respiratorio superior (cavidad nasal, faringe y esófago) y en el tejido linfático. Posteriormente se establece la viremia con generalización de la infección y replicación

en tejidos selectivos (epitelios de la cavidad bucal y mamario, espacios interdigitales, rumen, miocardio), con consecuente aparición de las lesiones y síntomas clínicos. La ruptura de las vesículas y el final de la fiebre coinciden con el comienzo de la producción de anticuerpos. Alrededor del 15° día el animal comienza a recuperarse de las lesiones, sin embargo, el virus puede persistir en el tejido esofágico-faríngeo por muchos meses en bovinos recuperados de la infección (Cottral, 1969). Los síntomas y la gravedad de la FA varían con la especie animal, serotipo y cepa del virus.

Las vesículas se rompen rápidamente, dejando una superficie erosionada, hemorrágica y granular. El dolor y las molestias por las lesiones llevan a una variedad de síntomas que incluyen depresión, anorexia, salivación excesiva, cojera y renuencia a moverse o levantarse. Los bovinos desarrollan lesiones en la lengua, almohadilla dental, encías, paladar blando y nariz. Las vesículas producen dolor y el animal se rehúsa a comer. Es común la salivación excesiva y la descarga nasal mucopurulenta. Los animales afectados se vuelven letárgicos, pueden perder rápidamente peso y tener disminuciones graves, graduales o repentinas en la producción de leche. Las lesiones de las patas causan cojera y/o renuencia a levantarse. Los terneros jóvenes pueden morir sin desarrollar vesículas.

La lactación se encuentra disminuida debido a las lesiones vesiculares y/o mastitis, y son comunes los abortos. La mortalidad en los terneros jóvenes puede llegar hasta un 50% debido a la miocarditis, aunque en adultos pocas veces es mayor del 5%. Las complicaciones más comunes son: erosiones de la lengua, superinfección de las lesiones, deformación de los cascos, mastitis, disminución permanente de la producción de leche, miocarditis y abortos.

1.6. Respuesta inmune contra el virus de la fiebre aftosa

Los animales infectados con el VFA desarrollan un estatus inmunológico que se caracteriza por altos niveles séricos de anticuerpos específicos con actividad neutralizante, los cuales persisten hasta 18 meses post infección (Wigdorovitz y Sadir, 1996). La protección frente a la infección por el VFA ha sido siempre relacionada con la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos (Pay y Hingley, 1992; Hingley y Pay, 1987). Sin embargo, es posible encontrar animales protegidos con niveles de anticuerpos neutralizantes sub-óptimos (Liebermann y cols., 1993; Francis y cols., 1985) lo que sugiere que la protección estaría mediada, además, por otros componentes del sistema inmune.

1.6.1. Respuesta inmune humoral

Cuando un bovino es infectado mediante la inoculación intra-dermolingüal de VFA, se comienzan a detectar anticuerpos neutralizantes específicos contra proteínas estructurales del virus a las 60hs, los que continúan ascendiendo hacia las 96 a 144 horas, con picos entre los 10 y 18 días post inoculación, que se mantienen hasta los 150 días (Dellers y Hyde, 1964).

La presencia de anticuerpos contra PNC como la ARN polimerasa (3D) y la proteasa viral (3C), llamados genéricamente “antígenos asociados a la infección viral, VIAA”; se ha utilizado como evidencia de infección en muchas especies (Schudel y cols., 1982). La duración de estos anticuerpos en animales infectados, es menor que los niveles de anticuerpos contra PC. No se ha establecido en detalle si existe un perfil diferencial de anticuerpos contra PNC en cada estadio de infección (agudo, convaleciente, estado portador).

De acuerdo con la literatura disponible (Mc Cullough K.C., 1986; Bergmann y cols., 2000) y la experiencia de nuestro laboratorio (Periolo y cols., 1993; Robiolo y cols., 1995), se ha comprobado que la inducción de una respuesta humoral con altos niveles séricos de anticuerpos específicos contra PC virales, garantiza una inmunidad adecuada y protección contra este virus (Collen, 1994).

Existe correlación entre los niveles de anticuerpos específicos medidos *in vitro* y la protección *in vivo* (Bekkum, 1969; Van Maanen y Terpstra, 1989). La infección con VFA produce un incremento de IgM específica entre los cuatro y cinco días posteriores a la infección, la cual decrece hasta los niveles basales pasados los 30 días. El cambio de isotipos (“switch de isotipos”) tiene lugar una semana después de la infección y se detecta principalmente un incremento en los niveles séricos de IgG específica. Es posible encontrar altos niveles de IgG1 anti-aftosa en la leche, incluso después de seis meses de recuperados de la infección (Armstrong, 1997).

En bovinos, los mecanismos humorales de protección contra la fiebre aftosa son poco conocidos. Mulcahy y cols. (1990) han sugerido que la capacidad protectora de las vacunas anti-aftosa (formuladas con virus inactivado) en el ganado, estaría relacionada con su habilidad de generar altos niveles de IgG1 anti-VFA (Mulcahy y cols., 1990).

1.6.2. Respuesta inmune celular

Las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) como los islotes de Langerhans, células dendríticas, células B y fagocitos, son capaces de presentar los antígenos a los linfocitos en el contexto del complejo de histocompatibilidad de clase II (MHC-II).

Se ha demostrado que las células T juegan un rol preponderante en el establecimiento de la memoria inmunológica de la respuesta inmune al VFA. Por otro lado, la captura y retención de complejos VFA-anticuerpo por células dendríticas foliculares parece ser un factor importante en la generación de células B de memoria (Francis y cols., 1985; Piatti y cols., 1991).

1.7. Diagnóstico epidemiológico

La Fiebre Aftosa pertenece al llamado complejo de enfermedades vesiculares, en el cual están incluidas también la Estomatitis Vesicular (EV), el Exantema Vesicular del cerdo y la Enfermedad Vesicular del cerdo (EVC). Esas enfermedades tienen en común la propiedad de provocar, en las especies afectadas, la formación de vesículas típicas, con epitelio blanquecino conteniendo líquido incoloro o ligeramente sanguinolento las cuales son patognomónicas para esas enfermedades. Debido a la semejanza de la sintomatología y de los signos clínicos entre las mencionadas enfermedades y de otras llamadas confundibles, el diagnóstico debe siempre basarse en las pruebas diagnósticas específicas y en un detallado estudio epidemiológico de rastreo.

El diagnóstico de la fiebre aftosa se basa en observaciones clínicas, epidemiológicas y de laboratorio. En el laboratorio se realiza el aislamiento del virus de tejidos o a partir del líquido esofágico-faríngeo. Se puede determinar la existencia de anticuerpos en el suero, a través de la prueba de Fijación de Complemento, prueba que aún es muy utilizada para la identificación del serotipo viral, junto con la tipificación por ELISA (Seki y cols., 2009), o la prueba de virus neutralización. La prueba de antígeno VIAA, las pruebas de ELISA para antígeno y anticuerpos, anticuerpos contra PNC, y pruebas de inmunoelotransferencia (EITB), son también utilizadas para caracterizar la enfermedad de acuerdo a criterios epidemiológicos (Seki y cols., 2009). También se utiliza la detección del ácido nucleico viral por RT-PCR y posterior secuenciación.

Una vez que se ha confirmado la presencia del VFA, es deseable que el diagnóstico se complete con una caracterización más profunda del agente en cuestión, que incluya estudios de tipificación, parentescos genéticos mediante análisis de la secuencia de nucleótidos de la proteína VP1 y antigénicos mediante ELISA, o por virus neutralización con sueros específicos, o caracterización por paneles de anticuerpos monoclonales (Seki y cols., 2009).

La vigilancia activa de la enfermedad se realiza mediante pruebas para la determinación de la circulación viral y la inmunidad poblacional. Las pruebas para la determinación de la circulación viral detectan anticuerpos contra las PNCs del virus independientemente del serotipo circulante o del estado de vacunación de la población bovina de la cual fueron retiradas las muestras. Dichas técnicas son: I-ELISA / 3ABC, EITB, IDGA-VIAA, 3ABC-ELISA (Robiolo y cols., 2006) y ELISA en fase líquida (aplicable únicamente en poblaciones que no han sido vacunadas). El nivel de inmunidad de la población es medido mediante técnicas de ELISA en fase líquida (Hamblin y cols., 1987; Maradei y cols., 2008), las cuales detectan los anticuerpos contra las proteínas estructurales del virus en el suero de los animales en estudio.

1.8. Control de la Fiebre Aftosa.

La estrategia global de lucha contra la fiebre aftosa comprende en primer lugar los sistemas de detección y alerta temprana y el establecimiento de medidas y mecanismos de prevención y de respuesta rápida, lo que posibilita el seguimiento y control de la aparición, prevalencia y caracterización de los virus de FA.

La protección de los países o zonas libres de fiebre aftosa se refuerza con medidas estrictas de control del movimiento de los animales susceptibles en las fronteras y de vigilancia sobre las importaciones.

Un planeamiento de contingencia en caso de eventuales focos identificará los elementos para la erradicación de la enfermedad, tales como:

- ✓ sacrificio de todos los animales infectados, recuperados y en contacto con los focos de la enfermedad y que son sensibles a la fiebre aftosa (rifle sanitario);
- ✓ eliminación adecuada de las carcasas y de todos los productos animales del área infectada;
- ✓ vigilancia y rastreo del ganado eventualmente infectado o expuesto;
- ✓ cuarentena estricta y controles del movimiento del ganado, equipos, vehículos; y

- ✓ desinfección completa de los locales y de todo el material infectado (implementos, coches, prendas de vestir, etc.)

La eliminación selectiva se podrá complementar con la vacunación del ganado susceptible (vacunación de emergencia). Las vacunas usadas deben proteger contra la cepa particular del virus prevalente en la zona (PANAFTOSA-OPS/OMS., 2007).

En los casos en que se utiliza la vacunación como medida de control, es importante un análisis de la potencial protección heteróloga de la cepa actuante por las vacunas o antígenos vacunales disponibles, para lo cual pueden realizarse pruebas *in vitro*, como relaciones de parentesco en base a títulos de anticuerpos neutralizantes o medidos por ELISA y/o pruebas *in vivo* como la protección de animales vacunados al desafío con la cepa circulante (Goris y cols., 2008; Mattion y cols., 2009; Robiolo y cols., 2010; Maradei y cols., 2011; Maradei y cols., 2013).

Adicionalmente a la comunicación inmediata a la OIE, los países que sufren una introducción de la enfermedad, deben cumplir con ciertos requisitos para poder solicitar rápidamente la restitución de su estatus. Estas medidas adicionales que se detallan en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE (OIE, 2016), incluyen: (a) la demostración de que se cuenta con un sistema de detección y alerta temprano; (b) la adopción de las medidas de contención y prevención apropiadas; (c) la comprobación fehaciente de que, una vez controlado el brote, no existe actividad viral remanente. (Bergmann y cols., 2005; Brocchi y cols., 2006).

1.8.1. Vacunación contra el VFA.

En lo que respecta a la vacunación contra la FA, en Argentina se utiliza una vacuna tetravalente, a virus inactivado con etilenimina binaria (BEI), formulada con adyuvante oleoso y saponina. Contiene las cepas O1/Campos, A24/Cruzeiro, A/Argentina/2001 y C3/Indaial. La duración de la inmunidad protectora es menor que la conferida por la infección, por lo que la vacunación de bovinos jóvenes debe realizarse dos veces por año, continuando una vez por año cuando son adultos (PANAFTOSA, 2016).

Las vacunas actualmente en uso se preparan por infección de células BHK- 21, a nivel industrial (Stoker y Macpherson, 1964), en plantas de Bioseguridad NBS3Agricultura (o 4 OIE) incluyendo cepas de diferentes serotipos virales según decisión de las autoridades sanitarias, dependiendo de la circulación o riesgo de circulación existente o identificado (Rweyemamu, 1984; Paton y cols., 2005; Mattion y

cols., 2009). Los sobrenadantes de los cultivos se clarifican por filtración para eliminar restos celulares y se concentran por precipitación del virus con polietilenglicol (PEG) o por ultrafiltración. El virus se inactiva con etilenimina binaria (BEI) que ha sustituido progresivamente a las vacunas basadas en la inactivación del antígeno viral con formaldehído (Bahnemann, 1975; Bahnemann, 1990; Barteling y Cassim, 2004). A pesar de la comprobada eficacia de las vacunas inactivadas convencionales, estas presentan también algunas desventajas, entre las cuales la necesidad de manipulación de virus infeccioso es una de las más notorias, por lo que se ha trabajado desde hace bastante tiempo en diferentes aproximaciones para el desarrollo de nuevas vacunas. Para resolver esta dificultad, se han realizado estudios con vacunas basadas en péptidos sintéticos (Villen y cols., 2002); también se ha abordado la generación de vacunas a subunidades proteicas (Strohmaier y cols., 1982; Abelson, 1982; Broekhuijsen y cols., 1986), incluyendo proteínas de fusión con antígenos foráneos, y nuevas vacunas atenuadas (Chinsangaram y cols., 1998; Mason y cols., 1997). Otras metodologías incluyen vacunas producidas a partir de partículas virales vacías (VLPs), (Abrams y cols., 1995; Lewis y cols., 1991; Grubman y cols., 1993). Si bien se cuenta con resultados promisorios, hasta la fecha ninguna de estas metodologías se ha mostrado completamente satisfactoria.

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

También se han utilizado adenovirus basado en el serotipo A24 (Ad5-A24) bajo el promotor CMV, vectores que han funcionado muy bien en el desarrollo de vacunas contra la fiebre aftosa. La vacuna se puede producir sin usar materiales infecciosos de FMD y es eficaz dentro de solo siete días después de la aplicación (Rodríguez y Grubman, 2009). Sin embargo, animales vacunados mediante construcciones con el serotipo O1 Campos (Ad5-O1C), fueron parcialmente protectivas a los 21 días post-vacunación. Recientemente, se demostró que la inclusión de la PNC 2B en el vector Ad5-A24, resulta en un incremento de la respuesta inmune en cerdos, y la inclusión de una modificación en el promotor CMV, aumenta la eficacia del vector. Estas dos modificaciones también, se evaluaron en el Ad5-O1C. Concluyendo que la región que codifica 2B, incrementa la eficacia de las vacunas Ad5 e induce una respuesta específica de linfocitos T CD4 y CD8, que correlaciona con la protección (Moraes y cols., 2011).

1.8.2. Determinación de anticuerpos contra proteínas capsidales. Control de vacunas y determinación de inmunidad poblacional

El nivel y duración de la inmunidad conferida por la vacuna depende principalmente de la calidad de la misma, además de las dosis recibidas, de la edad y la condición física e inmunológica del animal.

La prueba de potencia se realiza únicamente sobre el producto final, de manera directa "*in vivo*" o indirecta "*in vitro*". La prueba indirecta de las vacunas inactivadas se realiza mediante un inmunoensayo en fase líquida (ELISA-FL) con el suero de animales vacunados. Esta prueba permite establecer los niveles séricos de anticuerpos específicos totales. Se ha demostrado que existe una correlación entre el título de ELISA-FL y la protección contra el desafío con virus infeccioso (Periolo y cols., 1993). Esta correlación debe comprobarse para cada una de las cepas que componen la vacuna y resulta válida para toda la población de vacunas oleosas comerciales, cualquiera fuese la fuente de antígeno utilizada en su formulación (Robiolo y cols., 1995; Maradei y cols., 2011).

Esta correlación permite también en estudios poblacionales conocer el nivel de inmunidad al VFA y la expectativa de protección del ganado ante una eventual circulación viral.

1.8.3. Determinación de anticuerpos contra PNC. Detección de la circulación viral y vigilancia. Control de vacunas

La pureza de la vacuna constituye un requisito adicional. Esto exige a los productores de vacunas antiaftosa la demostración de la ausencia de inmunogenicidad contra las PNC del VFA.

La disponibilidad de vacunas purificadas en el mercado mundial representa una herramienta de fundamental importancia para el monitoreo y control de la enfermedad ya que permite la diferenciación entre animales vacunados e infectados (véase 1.8.4.).

La exitosa campaña sanitaria de control del VFA implementada en la Argentina en el período 2000-2002, por ejemplo, fue enormemente asistida por la combinación de dos tests: el 3ABC-ELISA que detecta anticuerpos reactivos con PNC del virus y un ELISA-FL para determinación de anticuerpos contra PC, ambos desarrollados y validados por el Centro de Virología Animal de CONICET (hoy ICT Milstein) en cooperación con SENASA y utilizados por más de una década para asistir a los servicios sanitarios locales y regionales y a los productores (Robiolo y cols., 2006), en la detección de la circulación viral en el campo y potencia y control de calidad de

vacunas y medición del nivel de inmunidad poblacional. El precursor 3ABC es la proteína más antigénica entre todas las PNCs y es el mejor indicador serológico de infección con el VFA (De Diego y cols., 1997).

Actualmente, las pruebas diagnósticas utilizadas en los muestreos realizados para el relevamiento de la situación para el programa de erradicación de la FA, buscan detectar inicialmente la presencia de anticuerpos contra PNC del VFA por medio del sistema ELISA-3ABC/EITB. El EITB, es un ensayo de Western blot que utiliza las PNC 3A, 3B, 2C, 2B, 3D y 3ABC para detección de anticuerpos en suero, y es utilizado como prueba confirmatoria ante casos positivos o sospechosos detectados por ELISA-3ABC (Bergmann y cols., 2005; Bergmann y cols., 1993) como indicador de infección.

1.8.4. Diferenciación de animales vacunados de infectados

Tanto las PC como las PNC inducen el desarrollo de anticuerpos en animales infectados. Los animales infectados quedan expuestos a las PNCs en el momento de la lisis celular, las cuales son producidas en cantidades equimolares debido a la estrategia de replicación del virus. En animales vacunados, que no han sido expuestos al virus vivo, se desarrollarán anticuerpos únicamente contra los antígenos virales que se encuentren en el material inactivado. Las vacunas semi-purificadas, inactivadas químicamente, inducen mayoritariamente el desarrollo de anticuerpos contra las PC del virus. Sin embargo, vacunas conteniendo PNCs además del virión inactivado, son capaces de inducir una respuesta inmune detectable dependiendo de su concentración (La Torre y cols., 1980).

Otra característica importante a ser considerada en las medidas de control y erradicación de la enfermedad, es la capacidad del VFA para establecer infecciones subclínicas persistentes, lo que se conoce como estado de "carrier", independientemente de si el animal fue vacunado antes de la infección. Las infecciones subclínicas podrían dar origen teóricamente a brotes de la enfermedad ya que los animales infectados estarían transmitiendo intermitentemente variantes virales que podrían diferir antigénicamente de la utilizada en la vacunación, colocando en riesgo incluso poblaciones vacunadas (Forss y cols., 1984).

Estudios para la detección de PNCs en sueros de animales convalecientes y de animales recuperados de la enfermedad, han definido que la detección simultánea de anticuerpos contra al menos dos PNC, excluyendo 3D, sería suficiente para demostrar replicación viral (Lea y cols., 1994).

En el Manual de la OIE para animales terrestres (2009), queda definido que para el reconocimiento del status de país libre de la enfermedad con vacunación, los animales vacunados deberán ser libres de anticuerpos contra las PNCs. Consecuentemente, los antígenos utilizados para producir vacunas contra el VFA deben ser purificados con el objeto de reducir la carga de PNCs de manera que la vacuna no induzca desarrollo de anticuerpos contra PNC (no detectable por ELISA), (Arnold y cols., 1987).

Actualmente en Sudamérica, la pureza de las vacunas comerciales es testada en carácter reprobatorio por los organismos de control actuantes en cada región (Rueckert 1985; Burroughs y cols., 1971). Los sueros de los animales que son inoculados para la prueba de potencia deben presentar ausencia de reactividad contra PNCs a 28 días luego de la primovacunación, y a 28 días luego de la revacunación, determinado mediante la prueba de ELISA 3ABC.

Debido a lo expuesto, es extremadamente importante poder diferenciar animales vacunados de animales que han sido infectados, incluyendo animales vacunados en los cuales ocurrió posteriormente la replicación viral sin manifestación de síntomas clínicos. Por otra parte, resulta imperativo para los productores de vacunas comerciales, obtener vacunas purificadas libres de PNCs que cumplan con los requisitos de calidad impuestos por los organismos oficiales de control.

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

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

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

La generación y aplicación de clones infecciosos está ampliamente distribuida y se cuentan con estas herramientas tanto para virus vegetales como animales (Racaniello y Baltimore, 1981; van der Werf y cols., 1986; Chapman y cols., 1992; Zimmermann y cols., 1994; Angell y Baulcombe, 1997; van Dinten y cols., 1997; Gritsun y Gould, 1998; Mendez y cols., 1998).

Genomas replicones en picornavirus pueden ser creados por deleciones en marco de lectura sin la región codificante de las proteínas de la cápside. Tales genomas son competentes en su replicación pero no pueden en capsidarse por sí mismos. Sin embargo, pueden ser encapsidados por un virus o sistema auxiliar, "*helper*", que provee las proteínas de la cápside en *trans*. Los sistemas de replicones para el VFA proveen una oportunidad única de estudiar la replicación del virus sin instalaciones de contención de alta seguridad, ya que, (a) ellos no pueden formar virus infecciosos por sí mismos, y (b) la recombinación con VFA circulante puede ser absolutamente descartada si el laboratorio está situado en una región libre de VFA (Tulloch y cols., 2014).

Nuestro grupo ha trabajado en el desarrollo de un sistema de genética reversa que permita recrear las funciones virales a partir de un clon infeccioso del VFA y un Replicón del mismo virus (Tesis Doctoral, Giraldez, 2013). El clon infeccioso aun no es funcional y se están estudiando las causas, tratando de corregirlas, pero existe el gran inconveniente de no disponer de un laboratorio con bioseguridad adecuada. Los experimentos de esta tesis se realizaron con el Replicón.

Objetivos

2. Objetivo General

El objetivo general del proyecto es evaluar el rol de la región amino-terminal de la proteína no capsidal (PNC) 3A en la replicación del ARN del virus de la Fiebre Aftosa (VFA), incluido el sitio de unión del anticuerpo monoclonal 3H7. El trabajo se inserta dentro de un proyecto de investigación del Instituto orientado a entender las bases moleculares de la replicación viral y en particular el rol de las PNCs y el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra regiones de importancia funcional para su uso como antivirales o en pruebas diagnósticas.

2.1. Objetivos Específicos:

Objetivo 1.

Puesta a punto de un sistema replicación/transcripción utilizando un minigenoma viral basado en un replicón plasmídico (pRep) en el que las proteínas estructurales del VFA han sido reemplazadas por un gen reportero, transcripto desde un promotor T7pol.

Este objetivo incluye la obtención de un replicón funcional, la obtención de un replicón no funcional para uso como control negativo y la puesta a punto de las variables del sistema que se basa en la medición de actividad reportera del gen de la Luciferasa.

Objetivo 2.

Identificación de dominios en 3A involucrados en la replicación/transcripción utilizando mutagénesis dirigida.

Generación de mutantes de la proteína 3A con deleciones parciales en la región amino terminal, construidas sobre el replicón pRep para evaluar el efecto en la eficiencia de replicación. Estudio de mutantes puntuales diseñadas en base a los resultados obtenidos con las mutantes con deleciones. Medición de replicación por actividad de Luciferasa.

Objetivo3.

Identificación en 3A de dominios involucrados en la asociación de la proteína a membranas internas o al citoesqueleto celular.

Construcción de un plásmido que contenga 3A unida a la etiqueta *Flag*, para detectar la ubicación intracelular de la proteína *wt* y con mutantes de delección definidas en el ítem anterior por medio de inmunofluorescencia indirecta (IFI) luego de transfección de células BHK. Las mutantes incluyen una delección en la región hidrofóbica predicha como transmembrana, en el marco del replicón pRep.

Objetivo 4.

Detección de anticuerpos contra 3A por ELISA utilizando un péptido quimera donde 3A está fusionada a GFP y comparación con el actualmente utilizado 3ABC-ELISA.

Generación de un péptido fusión 3A-GFP y desarrollo de una técnica de ELISA indirecta. Comparación entre los ELISAs 3A-GFP y 3ABC evaluando sueros de animales vacunados, y controles.

Objetivo 5.

Mapeo del sitio de unión a 3A del anticuerpo monoclonal 3H7.

Generación de mutantes de delección de 3A en un plásmido de expresión en bacterias que contiene el segmento genómico 3ABC del VFA, y evaluación de la reactividad de las mutantes expresadas con el anticuerpo monoclonal 3H7 por Western blot.

2.2. Construcción de la Hipótesis de trabajo y justificación general de la metodología

Se han definido diferentes funciones para la proteína 3A del VFA, algunas de las cuales han podido ser relacionadas con dominios específicos presentes en la misma. Sin embargo existen regiones aun no estudiadas en la zona amino terminal, las cuales podrían tener un rol importante en la actividad de replicación y/o transcripción. Para el estudio se dispone de un replicón capaz de transcribir a partir del promotor de la polimerasa del fago T7, las secuencias del VFA correspondientes a las regiones no codificantes, y las regiones codificantes de las proteínas no capsidales (P2 y P3) y donde la región codificante de las proteínas capsidales (P1) ha sido reemplazada con el gen reportero Luciferasa de luciernaga.

Se hipotetiza que se podrá evaluar la influencia de regiones específicas de la proteína 3A en la replicación viral, detectando niveles de generación de ARN con la proteína *wild type* y variantes producidas por mutagénesis dirigida (deleciones y mutaciones puntuales) de la región amino terminal, a través de la medición de los niveles de actividad del gen reportero, luego de transfección en células.

Siendo la zona de 3A la más inmunogénica del péptido 3ABC, que es usado rutinariamente en la diferenciación de animales infectados de vacunados, se plantea el desarrollo de un ensayo de ELISA más rápido y eventualmente más específico, uniendo esta proteína a un péptido *carrier* (GFP) para su uso en la evaluación de sueros por ELISA. En este caso la hipótesis es que sería capaz de distinguir sueros vacunales de sueros provenientes de infección por circulación del VFA.

Complementariamente, existiendo indicios de que el anticuerpo monoclonal 3H7 generado en nuestro instituto contra 3ABC está dirigido contra 3A, se plantea la posibilidad de mapearlo realizando deleciones seriadas amino terminales, expresión de los péptidos y posterior detección por *Western blot*. Definir la zona de unión específica de este anticuerpo a 3A aportará una herramienta valiosa para futuros estudios moleculares de la misma, así como para su uso eventual como bloqueante de la infección viral.

Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos.

3.1. Plásmidos.

Se trabajó con un plásmido Replicón (**pRep**) del virus de la Fiebre Aftosa, cepa O1/Campos, construido en nuestro laboratorio (Tesis Doctoral, Giraldez, 2013) a partir de ARN viral provisto por el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA). El mismo se construyó en base al plásmido **pKF4** (Hashimoto-Gotoh y cols., 1995).

Otros plásmidos utilizados fueron:

pEGFP-N1 (Clontech Laboratories)

pET-30a (Novagen)

pET-30a[3ABC]: pET30a que porta el segmento 3ABC del VFA conteniendo una mutación puntual en el sitio activo de la proteasa 3C que neutraliza su actividad autoprosesadora (Capozzo y cols., 2002)

pGEX-2T[GFP]: pGEX-2T (Invitrogen) que contiene el gen GFP (Tesis Doctoral, Romanutti, 2012)

pCA-T7: expresa la enzima T7ARNPol bajo el control del promotor de actina de pollo (Niwa y cols., 1991). Provisto por Ian Wickersham, MIT, *The Salk Institute for Biological Studies*, EEUU (Addgene plasmid # 59926).

pRL-CMV: (Renilla Luciferase Reporter Vector – Promega).

pTM1-Renilla: Expresa la enzima Luciferasa de *Renilla reniformis*, gen insertado bajo el promotor T7ARNPol del vector pTM1, y su transcripción es mediada por IRES (Tesis Doctoral, Foscaldi, 2016).

3.2. Células.

Se utilizaron células BHK-21 crecidas en monocapas, en placas multipocillos, o en botellas de cultivo estático, de acuerdo a los requerimientos de cada ensayo. El medio de cultivo utilizado fue Medio Esencial Mínimo Dulbecco (DMEM, Invitrogen), suplementado con 7% Suero fetal bovino (SFB), ("Fetal Bovine Serum, New Zeland Sourced", HyClone), glutamina 100mM, Penicilina 100mM, Estreptomina 100mM, Hepes 10mM y aminoácidos no esenciales 100mM.

Los cultivos se incubaron a 37°C en estufa de 5% CO₂.

3.3. Cepas bacterianas.

Se utilizaron bacterias *Escherichiacoli*, cepa DH10 β para la producción de ADN plasmídico y la cepa BL21(DE3) para la producción de proteínas recombinantes. Las bacterias se crecieron en medio Luria Bertani (LB) a 37°C en agitador rotatorio (200rpm), o en placas de Petri durante 16 horas (hs) (Sambrook, 1989). En ensayos específicos, se incluyeron antibióticos en las siguientes concentraciones: kanamicina (Kan) 50 μ g/ml y ampicilina (Amp) 100 μ g/ml.

3.4. Técnicas generales de biología molecular.

Las técnicas de biología molecular se realizaron según lo descrito en “Molecular Cloning” (Sambrook, 1989), “Current Protocols In Molecular Biology” (Ausubel, 2003) o siguiendo las indicaciones de los fabricantes de los reactivos o kits.

3.4.1. Diseño de primers.

Los *primers* se diseñaron en base a las secuencias templados, de acuerdo a la secuenciación por *primer walking* obtenida de pRep (Tesis Doctoral, Giraldez, 2013), o de secuencias obtenidas del GenBank (NCBI). Las secuencias de 3’-5’ se evaluaron en contenido de GC y temperatura de *melting* (Tm) con el *NEB Tm Calculator* (New England Biolabs, <http://tmcalsculator.neb.com>). Se añadieron sitios de restricción, etiquetas (*tag*), o sitio Kozak, cuando fue necesario.

La lista de los *primers* utilizados se puede consultar en el Anexo II.

3.4.2. Reacción de PCR con la enzima Pfx50.

Se utilizó la enzima Pfx50 (Invitrogen). Esta es una polimerasa de alta fidelidad, con una tasa de mutación 50 veces menor que la Taq polimerasa común, y cuenta con actividad de *hotstart* que reduce la amplificación inespecífica durante la reacción. Para la reacción se siguieron las indicaciones del proveedor.

3.4.3. Digestión con enzimas de restricción (ERs).

Para las digestiones de los diferentes ADNs y plásmidos se utilizaron entre 100 ng y 2 μ g de ADN (para *screening* o preparación de ADN para clonado, respectivamente), se utilizaron aproximadamente 5 U de ER (New EnglandBiolabs, Thermo o Promega)

por cada 500 ng de ADN a cortar. Utilizando el *buffer* de reacción (10x) indicado por el fabricante (llevado a volumen de 1 o 2X en agua calidad MiliQ previamente autoclavada), en un volumen final (Vf) de 20 a 100 μ l, en dependencia de la cantidad de ADN a utilizar. Las reacciones se incubaron de 2 a 8 hs, a la temperatura indicada para la ER. Para inactivación de la ER, se incubó la reacción 20 minutos (min), a la temperatura indicada por el proveedor.

3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.

Las concentraciones de agarosa utilizadas en los geles fueron entre 0,8% a 2%. Los geles se prepararon en *buffer* TBE 0,5 X y se corrieron a 50 Volts constantes. Para visualizar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). Al momento de sembrar, las muestras se mezclaron con *buffer* de siembra 6X (Sambrook, 1989). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron 100bp *DNA Ladder*, *Lambda HindIII*, *Lambda EcoRI-HindIII* y *L1 Kbp Plus* (Productos BioLógicos). La documentación de los geles se realizó con el equipo Multi Doc-it Imaging System (UVP).

3.4.5. Extracción y purificación de ADN.

Para todas las purificaciones se utilizó el kit “*NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*” (Macherey-Nagel). En el caso de purificación de gel de agarosa, se cortó el fragmento con un bisturí, procurando dejar la menor cantidad de agarosa residual posible. En el caso de purificación a partir de reacciones de PCR o reacciones de restricción, se llevó a un volumen mínimo de 100 μ l con agua MiliQ, y se procedió siguiendo las indicaciones del *kit*.

3.4.6. Mutagénesis por PCR de solapamiento.

Se siguieron protocolos existentes en la literatura (Higuchi y cols., 1988; Liang y cols., 1995; Urban y cols., 1997). Se diseñó un par de *primers* que poseen la modificación deseada, con no menos de 15 bases de complementariedad entre ellos en sus extremos 5' (*primers* B y C). Estos *primers* se utilizaron junto a *primers* externos (*primers* A y D) en PCRs por separado para obtener dos amplicones, los cuales llamaremos 1 y 2 (Figura 9 A). El amplicón 1 se obtuvo utilizando los *primers* A y B, y el amplicón 2 utilizando los *primers* C y D. Estos dos productos de PCR comparten un

segmento idéntico, donde se encuentra la modificación deseada, en uno de sus extremos.

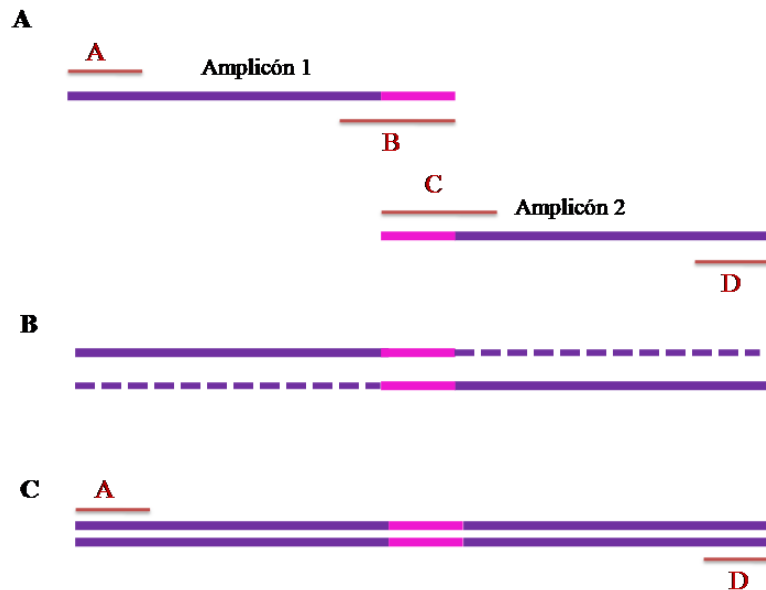


Figura 9. Mutagénesis por PCR de solapamiento. (A) Generación de dos amplicones que comparten un segmento idéntico. (B) *Annealing* y extensión de ambos amplicones. (C) PCR del segmento completo con los *primers* externos.

Ambos amplicones se purificaron por medio de una electroforesis preparativa y extracción de gel de agarosa, para eliminar los *primers* y productos de PCR inespecíficos. A continuación se hibridizaron ambos amplicones mediante un protocolo de desnaturalización, *annealing* y extensión de un solo ciclo, teniendo en cuenta la T_m del extremo que poseen en común y el tiempo de elongación según el tamaño (Figura 9 B). La mezcla de reacción se preparó incorporando los dos amplicones, dNTPs, la enzima Taq pfx50, en su *buffer* de reacción, pero sin *primers*. Luego de este primer ciclado, se agregan los *primers* externos y se programó una PCR de 35 ciclos, teniendo en cuenta el tamaño del amplicón completo, y la T_m de los *primers* agregados (Figura 9 C). Finalmente se purificó el ADN a partir de una electroforesis preparativa para su clonado.

3.4.7. Ligación de moléculas de ADN

Para el ligado de los insertos con los vectores correspondientes en cada caso particular, se utilizó una cantidad mínima (10-15 ng) del plásmido para reducir el religado del mismo, con relaciones molares inserto/vector variables. Por lo general se utilizaron proporciones entre 3:1 y 9:1. En todos los casos se incluyó un control de

vector sin inserto, el cual se denominó "control de religado". Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l, en presencia de *buffer* de ligación provisto con la enzima y 5U de enzima T4 ADN ligasa o *E. coli* ligasa (New England Biolabs). La primera tanto para extremos cohesivos como para extremos romos, mientras que la segunda se utiliza exclusivamente para extremos cohesivos. La reacción se incubó durante toda la noche (aproximadamente 16 hs) a 16 °C.

3.4.8. Transformación de bacterias competentes.

La inducción de competencia se realizó con el método de cloruro de calcio descrito en "*Current Protocols in Molecular Biology*", en el cual células *E. coli* en fase de crecimiento se concentraron por centrifugación y resuspendieron en una solución conteniendo cloruro de calcio. La exposición de los iones de calcio hace a las células capaces (competentes) de tomar ADN. Se fraccionaron (50-75 μ l por tubo) y se guardaron a -80°C para ser usadas posteriormente. Se realizó el ensayo de competencia para calcular la eficiencia de la preparación (Ausubel, 2003).

Para proceder con la transformación, se descongeló un vial de bacterias competentes sobre hielo. A cada tubo de bacterias se agregaron 5 μ l del producto de la reacción de ligación o 0,2 μ l de ADN en forma super-enrollada, dependiendo del caso. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 20 min. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42 °C por 45 segundos y se volvió a incubar en hielo por 2 min. Para la recuperación de las bacterias se agregaron 800 μ l de medio LB, se incubó 45 min a 37 °C con agitación suave y se plaqueó en medio LB-agar conteniendo el antibiótico apropiado para cada caso. Por último las placas se incubaron a 37 °C durante la noche.

3.4.9. Minipreparaciones de ADN.

Para estas preparaciones se partió de 3 ml de cultivo de bacterias en medio LB con el antibiótico apropiado, crecidas durante la noche a 37 °C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6.000 rpm y se resuspendieron en 200 μ l de Solución P1 con 5 μ g de Ribonucleasa A (Fermentas) por tubo. Luego, se agregaron 200 μ l de Solución P2, se mezcló por inversión lentamente y se incubó 15 min en hielo. Finalmentese agregaron 200 μ l de Solución P3 fría, se mezcló por inversión hasta que se observó la formación de un precipitado blanco y se incubó 15 min en hielo. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min. Se tomó el sobrenadante y se realizó una

extracción con 500 µl de cloroformo, mediante agitación de la mezcla y una centrifugación a 12.000 rpm por 5 min. Una vez separadas las fases se trasvasó la fase acuosa a un nuevo tubo, se agregaron 800 µl de isopropanol, se incubó 30 min a -20 °C y se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min. El precipitado se lavó con etanol 70% y, una vez seco, se resuspendió en 50 µl de agua destilada (Sambrook, 1989).

En el caso de los clones pRep, y sus mutantes, se modificaron las cantidades para poder obtener más microgramos de ADN, dado que se trabajó con plásmidos de bajo número de copias, y es difícil obtenerlos en buena concentración. Para estas excepciones se utilizaron 12 ml de cultivo de bacterias en medio LB, se centrifugó en 2 tubos eppendorf de 2 ml, (6 ml de cultivo en cada uno) y se prosiguió con el protocolo por duplicado, hasta que al final se unificaron los cultivos resuspendiendo en 40 µl de agua MiliQ ambos pellets.

3.4.10. Midipreparaciones de ADN.

Para la obtención de plásmidos con alto nivel de pureza para utilizar en la tranfección de células, se utilizó el kit “*NucleoBond® PC 100*” (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando buffers y columnas provistas.

En el caso excepcional de los clones pRep y sus mutantes, se tuvo que adaptar el procedimiento debido al bajo rendimiento del ADN obtenido siguiendo las indicaciones del fabricante.

En la primera parte del procedimiento, se cultivaron bacterias con el clon de interés en 3 ml de LB con el antibiótico adecuado a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se inocularon los 3 ml en 300 ml en medio LB y se realizó una Midipreparación. Para lo cual se centrifugaron las bacterias en 2 tubos Falcon de 50 ml (3 veces), se resuspendió el pellet en 2 ml de Solución P1 (con 50 µg de Ribonucleasa A), 3 ml de Solución P2, mezclando suavemente y incubando 20 min en hielo, 3 ml de Solución P3, mezclando 6 tiempos e incubando 20 min en hielo. Posteriormente se centrifugó 20 min a 12.000 x g. El sobrenadante se trasvasó a 2 mamaderas de 50 ml (de material resistente al cloroformo) y se agregaron 5 ml de cloroformo. Luego de mezclar vigorosamente, se centrifugó 10 min a 12.000 x g. Al sobrenadante se le agregó 8 ml de Isopropanol en tubos *corex* de vidrio, y se incubó 30 min a -20°. Posteriormente, se centrifugó 30 min a 15000xg. El pellet, se dejó secar, y se resuspendió en 1ml del *buffer* de equilibrio provisto con el kit “*NucleoBond® PC 100*”, se pasó la muestra por la columna, y se prosiguió con el protocolo del fabricante.

3.4.11. Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ADN fue realizada por el servicio de MacroGen Inc. (Corea del Sur) y por Genbiotech (Estados Unidos). Los ADNs se enviaron purificados.

3.4.12. Análisis de secuencias *in silico*.

Los alineamientos de secuencias de proteínas se realizaron con la aplicación *AlignX* del software *Vector NTI Suite*. Para alineamientos de secuencias de ADN se utilizó la aplicación *Contig Express* del mismo programa. También se utilizó *Vector NTI Suite*, para clonados, búsqueda de sitios de restricción, armado de vectores completos *in silico* y diseño de *primers*.

3.4.13. Transcripción *in vitro* con T7 polimerasa.

Se linealizó la construcción que se deseaba transcribir por digestión, utilizando de 5 a 10 µg de ADN plasmídico con un Vf de reacción de 50 µl en el buffer óptimo para la ER *EcoRV*. Para asegurar la digestión total de los ADNs las reacciones se incubaron por un período de 3 hs y se confirmó la digestión mediante una electroforesis en un gel de agarosa 1%. Luego se purificó el total de la digestión con el kit “*Nucleo Spin® Gel and PCR Clean-up*” (Macherey-Nagel).

La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el kit “*MEGAscript®*” (Ambion) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó 1 µg del templado de ADN. Se incubaron las reacciones durante 5 hs a una temperatura de 37 °C. Una vez cumplido el tiempo de incubación se realizó un tratamiento con ADNasa (*TURBO DNase I*) de 15 min a 37 °C. El ARN sintetizado fue purificado con el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega). Se confirmó la integridad del ARN mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de agarosa 1%. Se midió la concentración con el equipo *NanoDrop*, se dividió en alícuotas y se guardó a -80°C.

3.5. Construcción de los distintos plásmidos y mutantes del Sistema Replicón.

El Replicón (pRep) consiste en un cADN derivado del genoma viral de la cepa O1 Campos, donde las secuencias que codifican para proteínas estructurales fueron reemplazadas por el gen reportero Luciferasa de Luciérnaga (*Firefly Luciferase, Luc*) y solo se conservaron los aa que conforman los sitios de corte para las proteasas Lpro y

3Cpro (Tesis Doctoral, Giraldez, 2013), (Figura 10). La transcripción del ARN viral está bajo el control del promotor de la polimerasa del fago T7 (T7pol), el cual genera la posibilidad de la transcripción *in vitro* del ARN y posterior transfección del mismo; o la cotransfección junto con un plásmido que la expresa (pCAT7). De esta forma la replicación del pRep se determina indirectamente evaluando la actividad del gen reportero (Figura 11).

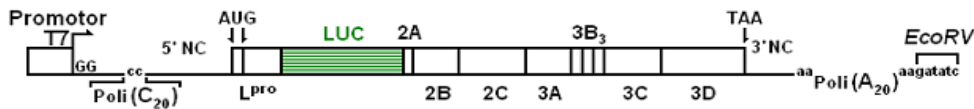


Figura 10. Replicón del VFA. Representación esquemática del sistema replicón del VFA, derivado de la cepa O1 Campos, bajo el promotor de la polimerasa del fago T7. (De: Giraldez, 2013)

Si bien se conocen muchos aspectos básicos de la biología molecular de los *Picornavirus*, y entre ellos VFA, el papel de las regiones no codificantes del genoma viral y la función de las proteínas virales o sus precursores requieren mayor investigación para ser comprendidos en profundidad. La utilización de esta herramienta permitirá ahondar en el rol de los componentes virales que controlan la expresión génica del VFA inicialmente utilizando pRep.

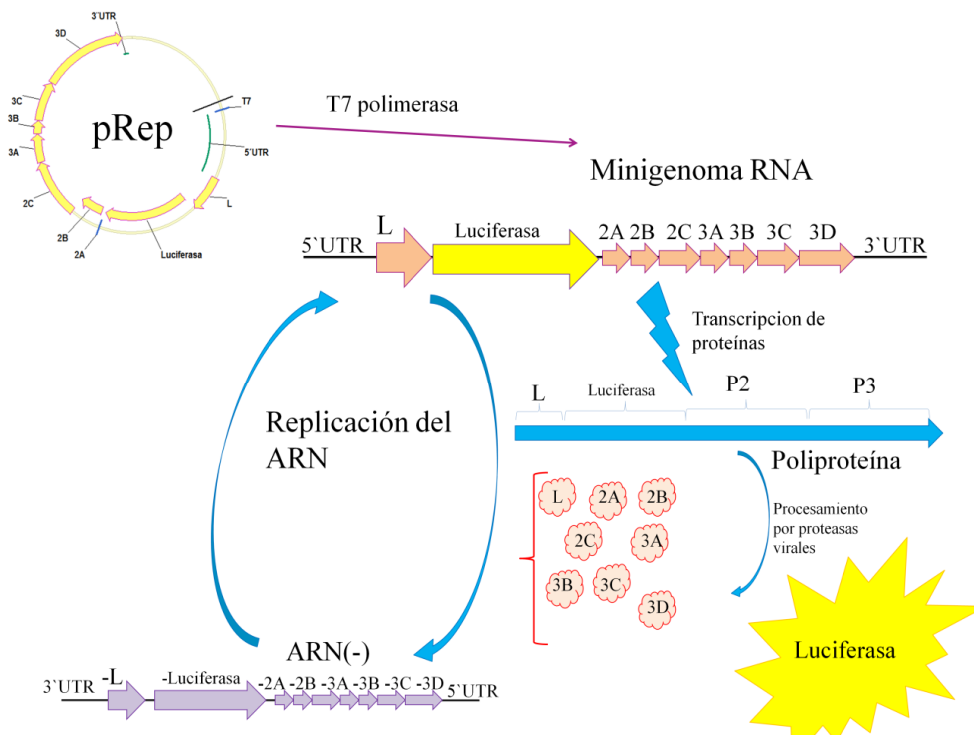


Figura 11. Sistema Replicón. Representación esquemática del sistema replicón del VFA, en el cual se transcribe el Minigenoma de ARN por medio de la T7pol, y es traducido en una poliproteína, procesada por proteasas virales, las cuales liberan la Luciferasa, cuya actividad medible permite evaluar la replicación del sistema. Las proteínas virales se encargan de replicar el Minigenoma, liberando más Luciferasa.

La construcción del Replicón (pRep) y un Clon de Genoma Completo, fue llevada a cabo por Adrian Giraldez y cols., pero a pesar de múltiples intentos, no se obtuvo un clon funcional. Varias mutaciones fueron evaluadas y corregidas, sin resultados positivos (Tesis Doctoral, Giraldez, 2013).

3.5.1. Corrección de pRep Δ G4120 para la obtención del plásmido pRep funcional

En primer lugar se procedió a identificar por secuenciación con el método de *primer walking* la deficiencia del plásmido replicón (pRep) construido en el laboratorio. Se detectó una mutación puntual con corrimiento del marco de lectura en la secuencia de la proteína NC 2B, específicamente una guanocina en posición 4120 (pRep Δ G4120).

Con el fin de corregir esta mutación se amplificó la región a partir del clon de genoma completo de la cepa O1 Campos (pk-VFA-/O1/Cam) con los *primers* específicos 2A.Fowy 3A.1/2.Rev (ver AnexoII). El producto de PCR, fue digerido con las enzimas de restricción (ERs) *XmaI* y *EcoRI*, de sitio único en el genoma del virus (región genómica 3766-5427). Simultáneamente fue digerido con las mismas ERs el pRep Δ G4120. Ambos ADNs fueron purificados y se procedió con la ligación del fragmento correcto en pRep. Posteriormente se verificó la construcción mediante restricción con la ER *HindIII* (clones correctos liberan bandas de 2601 pb, 2589 pb, 2504 pb, 1470 pb, 566 pb y 43 pb; vector vacío libera bandas de 3633 pb, 2504 pb, 1470 pb, 566 pb y 43 pb). Se secuenciaron los clones positivos para corroborar la incorporación del segmento suplantado.

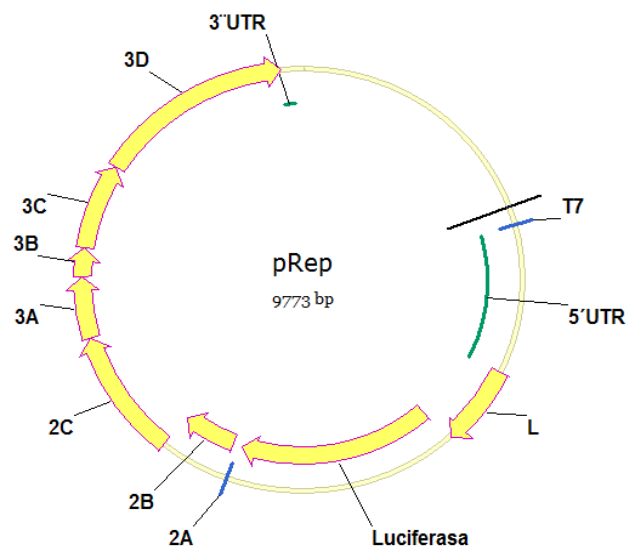


Figura 12. Esquema del plásmido pRep (replicón funcional), obtenido con las secuencias provenientes del *primer walking* y el programa Vector NTI. Se indica el promotor T7 pol, las regiones 5' y 3' no codificantes (UTR), el gen de Luciferasa y las proteínas no capsidales del VFA.

Finalmente, luego de evaluar las secuencias, se logró la construcción del replicón del VFA-O1/Campos (pRep) con capacidad de transcripción/replicación medible a través de la actividad luciferasa (Figura 12)

3.5.2. Construcción del Replicón Defectivo 1 (pRepD1).

Inicialmente, se generó un replicón deficiente en la polimerasa 3D el cual se denominó pRep Defectivo1 (pRepD1) para lo cual se aprovecharon 2 sitios únicos de restricción, dentro del genoma viral, y se procedió a realizar una deleción de 838 pb flanqueada por dos sitios *PstI*. El resultado sería una deleción en 249 aa en el extremo N-terminal de 3D y 31 aa en el extremo C-terminal de 3C. De esta forma también se elimina el sitio de corte 3CD, entre 3C y 3D.

Luego del corte con *PstI*, las bandas se separaron en un gel de agarosa 1%, se aisló la correspondiente al vector, se purificó y se religó (Figura 13). Se realizó el screening con la misma ER *PstI*, se eligió un clon que no desprendiera un segmento de aproximadamente 800 pb.

Se obtuvo la cantidad de ADN necesaria mediante una midipreparación, se linealizó con *EcoRV*, se transcribió a ARN y se purificó para su posterior transfección.

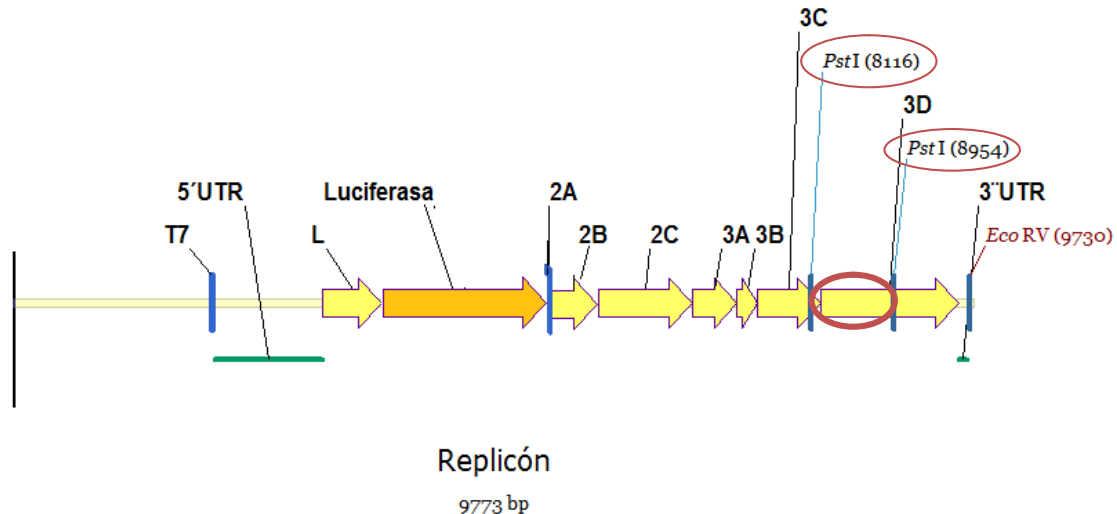


Figura 13. Esquema de la construcción de un Replicón Defectivo (pRepD1). Obtenido con las secuencias provenientes del *primer walkingy* del pRep y el programa Vector NTI. Se indica el promotor T7 pol, las regiones 5' y 3' no codificantes (UTR), el gen de Luciferasa y las proteínas no capsidales del VFA, y la enzima de restricción *EcoRV*, utilizada para la linealización del mismo. pRepD1 se obtuvo mediante la deleción de 838 pb en pRep utilizando los sitios de restricción *PstI* del genoma viral, marcadas con un óvalo.

3.5.3. Construcción de *pRepSuperDeletado* (*pRepSD*)

La construcción de *pRepSD* se realizó utilizando el corte de sitios únicos en el *pRep* de las ERs *EcoRV* y *SmaI*, que realizan cortes de extremo romo. Una vez cortado el plásmido, se separaron en un gel de agarosa 2%, las dos bandas, una de 5453 pb y otra de 5671 pb. Se purificó la de 5453 pb que correspondía a la región de la Luciferasa, y se religaron los extremos romos (Figura 14). El clon a utilizar se seleccionó por screening por restricción y peso molecular.

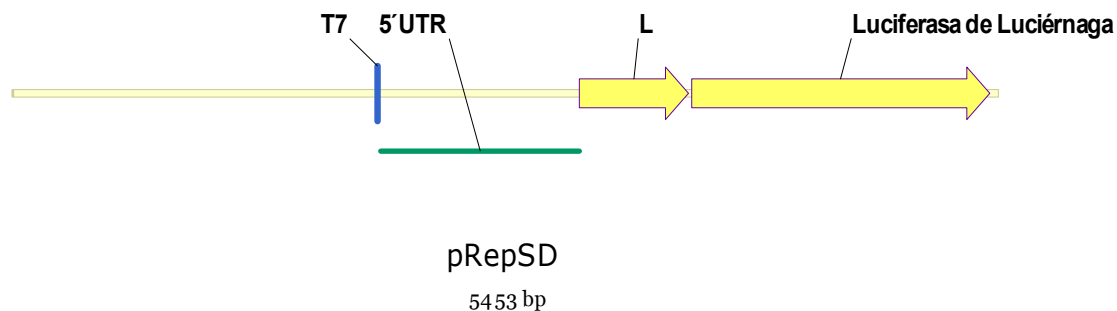


Figura 14. Esquema del plásmido *pRepSuperDeletado*. Obtenido con las secuencias provenientes del *primer walkingy* del *pRep* y el programa Vector NTI. Se indica el promotor T7 pol, las regiones 5' no codificantes (UTR), el gen de Luciferasa y la proteína L del VFA.

3.5.4. Construcción de mutantes de la proteína 3A con deleciones parciales en la región N-terminal, en el background del plásmido *pRep*.

Inicialmente, se analizaron las secuencias nucleotídicas de la proteína 3A en distintas cepas virales, observando secuencias ampliamente conservadas en la región N-terminal de la misma.

Luego, se alinearon secuencias de 3A del VFA junto con la misma proteína de otros virus de la misma familia: PV, Rinovirus, y Enterovirus. En este caso, no se encontraron regiones conservadas en términos de nucleótidos.

Se construyeron 3 mutantes de deleción en la región N-terminal de 3A, denominadas $\Delta 6-11$, $\Delta 6-17$ y $\Delta 6-23$ de acuerdo al orden y ubicación de los aminoácidos delecionados (Figura 15).

Para la construcción de estas mutantes, se diseñaron *primers* reversos aprovechando el sitio único de la ER *EcoRI*, dentro de la proteína 3A del virus, incorporando las deleciones en ellos nombradas $\Delta 6-11$, $\Delta 6-17$ y $\Delta 6-23$ (*Del1.3A.Revers*, *Del2.3A.Revers* y *Del3.3A.Revers*, respectivamente). Se diseñó un único primer *foward* que hibrida en la región de la proteína 2B, también aprovechando un sitio único de

restricción del genoma viral, utilizando la ER *PmlI* (*2B.Fow.PmlI*), (Ver Anexo II).



Figura 15. Esquema de la proteína no capsidial 3A. Secuencia de aminoácidos y esquema mostrando las dos alfa-hélices y la zona transmembrana predicha. Se indican las tres delecciones realizadas. Los aminoácidos se representan en distintos colores en función de sus características físico-químicas: verde, polar sin carga; rojo, apolar; azul, polar con carga negativa; rosa, polar con carga positiva.

Luego se amplificó la región de interés, con cada juego de *primers*, utilizando para todos 60°C como temperatura de *annealing* (Ta) y pRep como templado. Los segmentos y el vector (pRep), se cortaron con las ERs *PmlI* y *EcoRI*, y se procedió a realizar una separación electroforética para su posterior purificación y ligación.

En el caso de pRep digerido, liberó un fragmento de 1138 pb, el cual fue descartado (Figura 16). Las amplificaciones de las mutantes resultaron en fragmentos de 1123 pb, 1103 pb y 1083 pb.

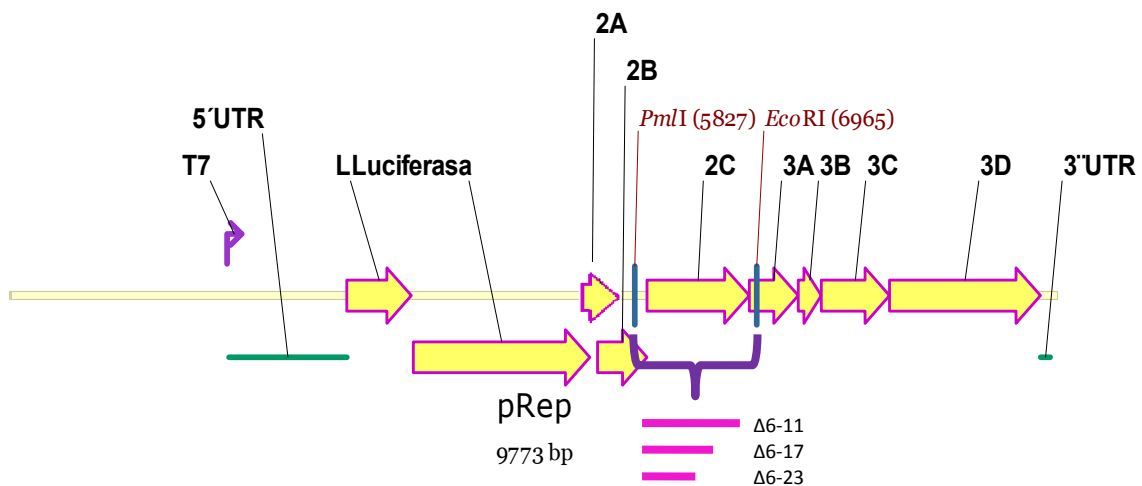


Figura 16. Esquema del subclonado en pRep para obtener las distintas mutantes de delección de 3A. Los fragmentos con las delecciones (Δ6-11, Δ6-17 y Δ6-23) se subclonaron entre los sitios de restricción representados con barras azules en 2B (*PmlI*) y 3A (*EcoRI*).

Se seleccionaron candidatos para cada clon, mediante restricción con las mismas ERs utilizadas para el clonado, y se envió a secuenciar para corroborar la correcta incorporación del inserto y su integridad.

De esta forma, se obtuvieron tres plásmidos replicón, los cuales fueron nombrados pRep Δ 6-11, pRep Δ 6-17 y pRep Δ 6-23.

3.5.5. Construcción de los plásmidos con mutaciones puntuales de 3A (pRepQ18A/H19A/E20A y pRepE20A).

Se logró el primer clon denominado pRepQ18A/H19A/E20A, por reemplazo de los aminoácidos de las posiciones 18, 19 y 20 por el aminoácido alanina, y el segundo clon, denominado pRepE20A, en el cual solo se reemplazó el aminoácido Ácido Glutámico (E), por una alanina (Figura 17).

Ambos clones se obtuvieron mediante el diseño de un par de *primers* reversos específicos con la zona mutada, *Mut1.3A.Revers*, se utilizó para lograr el mutante pRepQ18A/H19A/E20A, y el *primer Mut2.3A.Revers* para la mutación pE20A, en ambos casos, los *primers* reversos presentan el sitio de restricción *EcoRI*. Los productos de PCR se lograron utilizando como *primer forward* en ambos casos el *primer 2B.Fow.PmlI* conteniendo el sitio para *Pml* (ver Anexo II).

Para las reacciones de PCR, la Ta utilizada fue de 60°C. Los sitios de restricción utilizados son únicos en el genoma de pRep, para luego permitir el clonado directo de los productos de PCR sobre el clon original.

Se obtuvieron clones candidatos realizando un *screening* con las ERs *PmlI* y *EcoRI*. Se enviaron a secuenciar para corroborar la incorporación de la mutación y la corrección de la secuencia amplificada.



Figura 17. Esquema de las mutantes puntuales de 3A. Esquema de la sección N-terminal de la proteína 3A del VFA, los aa 17-23 se representan en color rojo y las zonas de hélice- α , por los cilindros azules. Las posiciones de reemplazo por A (alanina), se encuentran en letra más grande y en color rojo.

3.5.6. Construcción del plásmido con la delección de la región transmembrana de 3A (pRep Δ TM)

Para obtener esta mutante, se utilizó la técnica de PCR por solapamiento, en la cual para el primer segmento se utilizaron los *primers Fow.3A.EcoRI* y *Rev.3A. Δ transm*

(100pb), y para el segundo segmento se utilizaron los *primers Fow.3A.Atranm* y *Rev.3D.MluI* (1300pb) ambos con una Ta de 40°C. Las bandas fueron separadas en gel de agarosa y purificadas, ya que contenían fragmentos inespecíficos.

Luego, ambas PCR se solaparon a una Ta de 60°C, en donde posteriormente se agregaron los *primers Fow.3A.EcoRI* y *Rev.3D.MluI* para realizar la PCR del segmento entero (1500 pb) utilizando una Ta de 40°C.

El producto obtenido, y el plásmido pRep, fueron digeridos con las ERs *EcoRI* y *MluI*, purificados y ligados, para obtener el plásmido pRep Δ TM. Los posibles candidatos elegidos por restricción se enviaron a secuenciar para corroborar la incorporación de la secuencia con la mutación esperada.

3.6. Construcción de los plásmidos utilizados en ensayos de Inmumofluorescencia indirecta (IFI).

3.6.1. Construcción de los plásmidos p3AF, p Δ 6-11F, p Δ 6-17F y p Δ 6-23F.

Se construyeron plasmidos conteniendo solo la secuencia de la proteína 3A, y las mutantes de 3A construídas anteriormente, fusionadas a la etiqueta *Flag*. Los plásmidos se denominaron: p3AF, p Δ 6-11F, p Δ 6-17F y p Δ 6-23F.

Se diseñaron los siguientes *primers* específicos:

✓ Como *primer forward* se utilizó *3A.Fow.HindIII.Flag*, el cual posee la secuencia de corte de la ER *HindIII*, la secuencia Kozak para aumentar la eficiencia de transcripción, un codon de iniciación ATG seguido por la etiqueta *FlagY*, y por una secuencia que hibridiza sobre el gen 3A, en la zona inmediata anterior a las bases delecionadas en las mutantes.

✓ Como *primer reverse*, se utilizó en todos los casos, *3A.NotI.Rev.*, el cual posee una secuencia que hibridiza sobre 5' del gen 3A, el codon stop y el sitio de restricción *NotI*.

La secuencia de *Flag-Y* se obtuvo del estudio de Teterina y cols. (Teterina y cols., 2011), quienes evaluaron distintas etiquetas en clones infecciosos de PV insertos en el extremo N-Terminal de la proteína 3A, y observaron que *Flag-Y* no interfería en la generación de placas de lisis, las cuales, eran idénticas a las producidas por el virus *wt*. Se eligió insertar la etiqueta en el extremo N-terminal de 3A, asumiendo que no afectaría estéricamente la conformación de la proteína. Debido a la longitud del *primer forward*, se utilizó una Ta de 40 °C (Ver AnexoII).

El vector pEGFP-N1, que contiene el gen EGFP, se utilizó como control de transfección, y también para armar las mutantes (Figura 18). Se cortaron con las ERs *HindIII* y *NotI*, tanto el vector como los productos de PCR amplificados de las diferentes mutantes a clonar. Se purificaron los fragmentos de interés y se ligaron. Se realizó el *screening* utilizando las mismas ERs, y se separaron los fragmentos en un gel de agarosa 2%, para facilitar la identificación de los mismos. Los clones seleccionados, se enviaron a secuenciar.

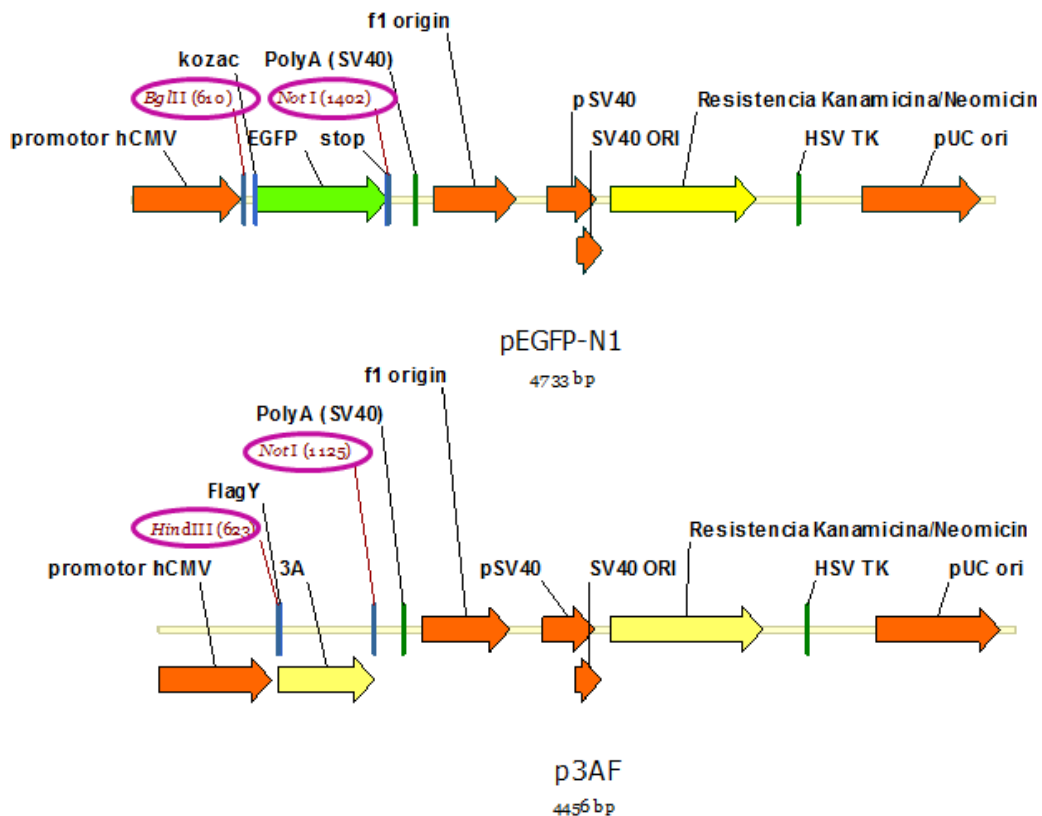


Figura 18. Esquema de la construcción del plásmido p3AF, a partir de pEGFP-N1. Se reemplazó el gen de la proteína EGFP, por el de la proteína no capsidial 3A con una etiqueta *FlagY* unida a su N-terminal utilizando las ERs *HindIII* y *NotI*, (círculos violeta).

3.6.2. Construcción de los plásmidos pEGFP[3A] y pEGFP[3AF]

Para la construcción de pEGFP[3A], se utilizaron los *primers* *3AgreenFy* *3AgreenR* (Ver AnexoII) para obtener el producto de amplificación de 3A, y clonarlo en pEGFP-N1 con las ERs *BglII* y *BamHI*. En este caso se utilizó la enzima CIP (Thermo), para extraer los fosfatos del vector, ya que los extremos producidos por el corte de las ERs utilizadas eran idénticos: *BglII* corta en el sitio AGATCT y *BamHI* corta en el sitio GGATCC, pero ambas dejan libre el extremo GATC. La enzima CIP luego se inactivó por calor (10 min a 70°C), y se prosiguió normalmente.

Para obtener pEGFP[3A-F], los vectores pEGFP[3A] y p3AF se cortaron con las ERs *NheI* y *EcoRI*. En el caso de pEGFP[3A] se recupero el vector (Figura 19 A), y de p3AF se recupero un fragmento de 102 pb, codificando la etiqueta *FlagY* (Figura 19 B). Se utilizo un gel de agarosa 2% para purificar esta pequeña banda. Luego de ligar, se seleccionaron los clones de interés mediante *screening* con las ERs *HindIII* y *BamHI*, dado que la primera se incorpora cuando el inserto está incluido mientras que el vector vacío no posee este sitio de restricción. Los clones elegidos liberaron una banda de 497 pb (Figura 19 C).

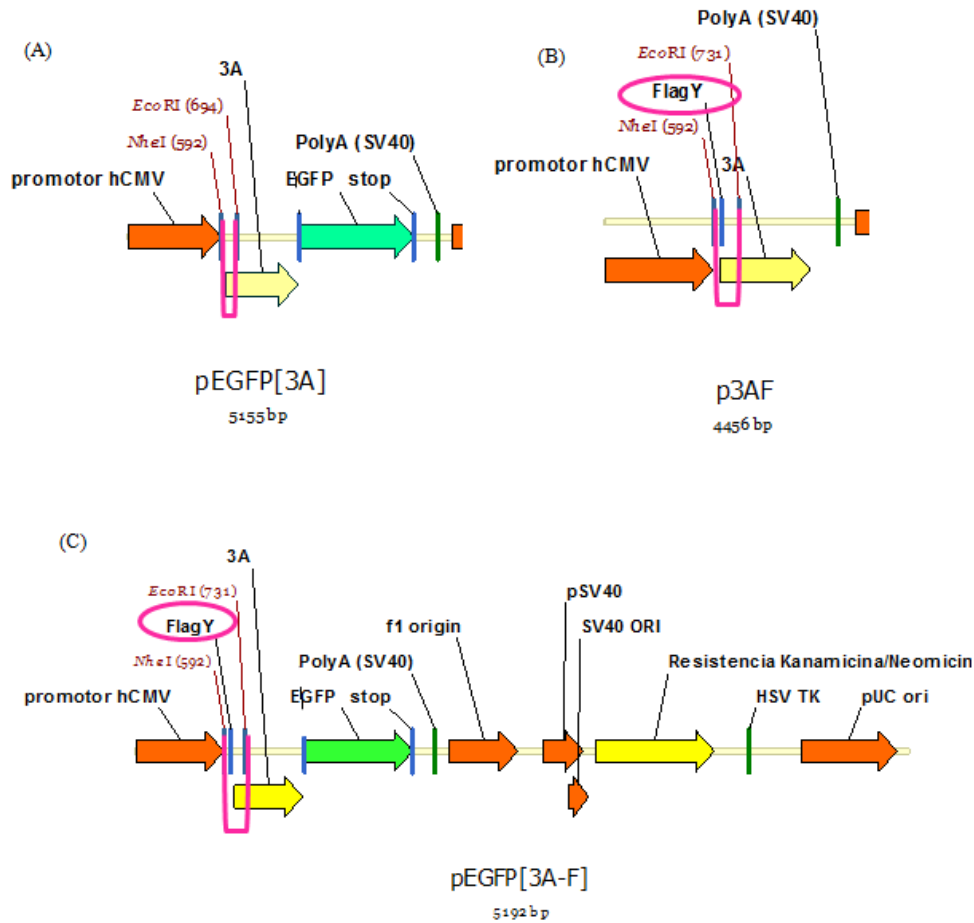


Figura 19. Esquema de la construcción del plásmido pEGFP[3A-F], a partir de pEGFP[3A] y p3AF. Se subclonó el segmento conteniendo el *FlagY* y parte del gen 3A, utilizando las ERs *NheI* y *EcoRI*. (A) Región del plásmido pEGFP[3A], se marca con una U fucsia el segmento eliminado para utilizar el plásmido como vector. (B) Región del plásmido p3AF, que se utilizó como inserto. (C) Esquema del clon pEGFP[3A-F] final, en el cual se resalta en fucsia el segmento clonado.

3.6.3. Construcción de los plásmidos $p\Delta TMF$.

Se construyó un plásmido con la mutante transmembrana denominado $p\Delta TMF$.

Se utilizó la técnica de PCR por solapamiento, empleando para el primer segmento los *primers* *3A.Fow.HindIII.Flag* y *Rev.3A.Δtransm*, con una Ta de 45°C,

mientras que para el segundo fragmento se utilizaron los *primers* *Fow.3A.Δtranm* y *3A.NotI.Rev* (Ver AnexoII), y una Ta de 56°C.

La reacción de PCR de solapamiento se realizó con 25 ul de cada producto de PCR obtenido, Taq polimerasa y dNTPs, con una Ta entre segmentos de 66°C, durante 30 min. Se procedió luego a la elongación (10 min) a 68°C. Posteriormente, se agregaron los *primers* de los extremos *3A.Fow.HindIII.Flagy 3A.NotI.Rev* y se realizó la amplificación completa con una Ta de 64°C.

El producto de PCR final obtenido, se purificó y se clonó en el vector pEGFP-N1, previo corte de ambos con las ERs *HindIII* y *NotI*. Se seleccionaron los clones por *screening* con las mismas ERs, y se enviaron a secuenciar. Una vez corroboradas las secuencias, se realizaron las midipreparaciones para proceder con las transfecciones.

3.7. Construcción de los plásmidos Clon infeccioso.

3.7.1. Construcción de los clones a evaluar como Clon Infeccioso.

Luego de que obtuvimos el Replicón funcional, descrito anteriormente, se realizaron dos clonados, en los cuales se utilizó la técnica inversa, reemplazando el gen que codifica la Luciferasa por las proteínas de la cápside.

Boyer y Haenni (1993) recalcan la inestabilidad de los ADNc de genomas virales en bacterias, y ejemplifican casos de clones completos de virus con genomas de ARN de cadena positiva en los cuales dicha inestabilidad produjo la introducción de mutaciones que resultaron en la no infectividad de los transcritos obtenidos.

Para descartar esta opción, realizamos dos clonados, utilizamos como inserto, las proteínas capsidales del clon de genoma completo del cual disponemos, al vector pRep. De esta forma, descartamos cualquier mutación de inestabilidad de ADNc que pudo haberse generado en el resto del genoma viral.

Mediante la utilización de sitios de restricción existentes en el genoma viral, se realizaron dos clonados:

- ✓ *XmaI* y *SpeI*, con los cuales se reemplazó Luciferasa, por las proteínas capsidales, Lpro y el 5'UTR, los clones resultantes.
- ✓ *XmaI* y *AflIII* reemplazando mitad de la proteína Lpro, luciferasa, por las proteínas capsidales, conservando el 5' UTR del sistema Replicón.

En la Figura 20, se puede observar un esquema del Clon Completo y de pRep, señalando en líneas azules los sitios de restricción de las ERs utilizadas para el clonado de ambos.

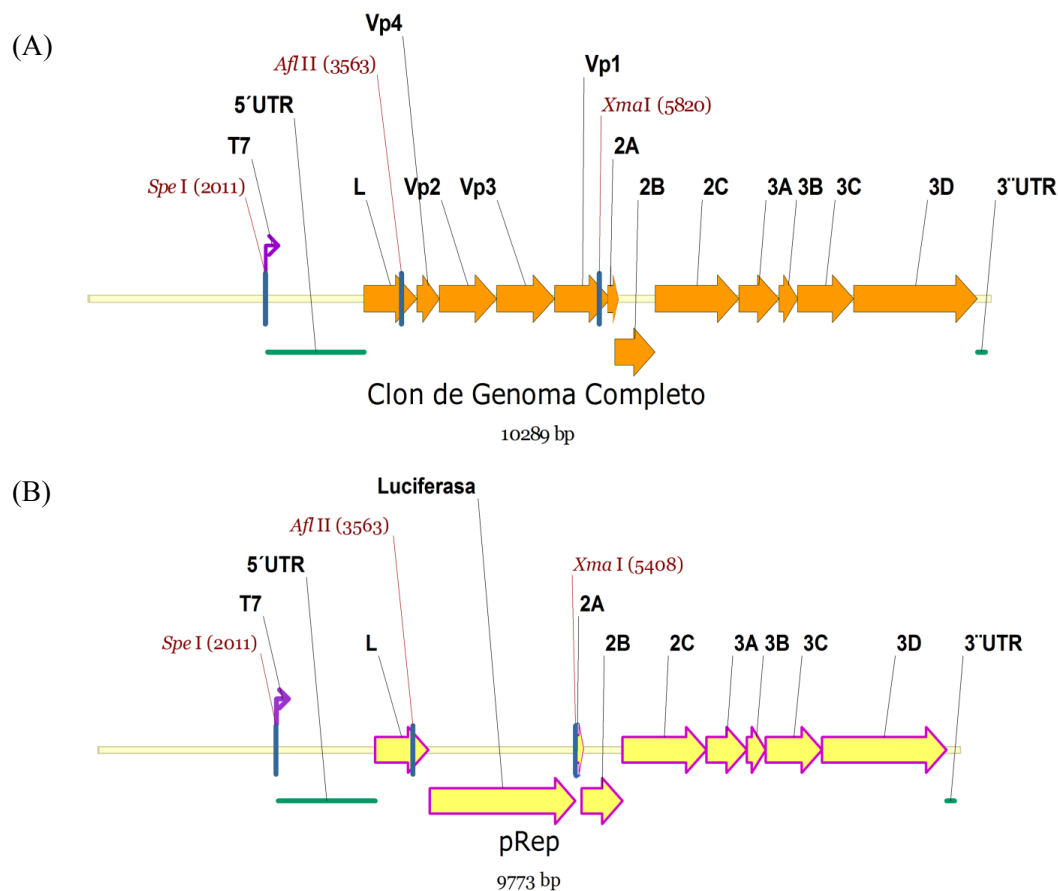


Figura 20. Clon de genoma completo yReplicón del VFA. Representación esquemática del Clon de Genoma Completo (A) y del sistema replicón del VFA, pRep (B), ambos derivados de la cepa O1 Campos de dicho virus, bajo el promotor de la polimerasa del fago T7.

3.8. Construcción de los plásmidos utilizados en el mapeo del anticuerpo monoclonal 3H7.

3.8.1. Construcción de los clones delecionados del polipéptido 3ABC.

Se realizaron 6 deleciones secuenciales en el extremo 5' del segmento 3ABC. Los fragmentos, que difieren aproximadamente en 60 pares de nucleótidos, fueron clonados en pET-30a, dando lugar a los clones que se denominaron B, C, D, E, F y G (Figura 21). Para obtener estos clones se realizó una PCR utilizando como templado el clon A (pET-30a[3ABC]), por medio de los *primers*: *3A.NcoI.FowB*, *3A.NcoI.FowC*, *3A.NcoI.FowD*, *3A.NcoI.FowE*, *3A.NcoI.FowF* y *3A.NcoI.FowG* como directos y como reverso se utilizó el *primer 3A.BamHI.Rev* (Ver AnexoII), en todos los casos, a una Ta

de 45°C. Los *primers* cuentan con el agregado de los sitios de las ERs *NcoI* y *BamHI* para su clonado posterior.

Cada uno de los segmentos fue purificado y clonado en el vector pET-30a, previamente cortado y purificado.

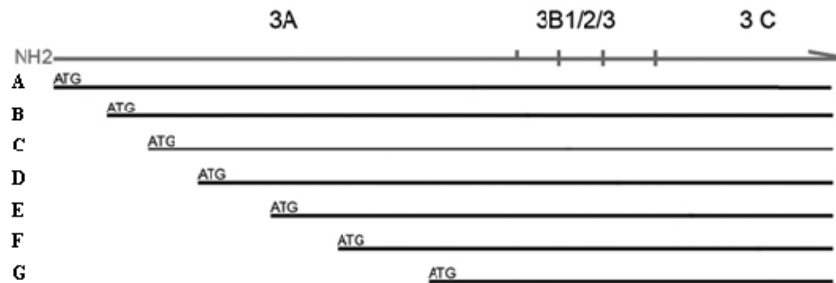


Figura 21. Esquema de delecciones N-terminales en el ADN codificante del polipéptido 3ABC.

Los clones obtenidos luego de la selección con las mismas ERs utilizadas para el clonado, generaron bandas, por corrida electroforética en un gel 2%, de los siguientes tamaños: A, 1311 pb; B, 1254 pb; C, 1197 pb; D, 1140 pb; E, 1080 pb; F, 1020 pb, y G, 960 pb. Los clones positivos se enviaron a secuenciar.

3.8.2. Construcción de clones que portan los péptidos N-terminales de 3A fusionados a EGFP (19-GFP, 29-GFP, 38-GFP) y 3A-GFP

Se diseñaron 3 clones, con aminoácidos de la secuencia del N-terminal de la proteína 3A fusionados a EGFP como proteína *carrier*. Las construcciones diseñadas se representan en la Figura 22 y contienen:

- ✓ p19-GFP, contiene los primeros 19 aa N-terminales de 3A, los cuales se encuentran en el clon A pero no en el clon B;
- ✓ p29-GFP, contiene 29 aa N-terminales de 3A, de los cuales 19 aa se encuentran en el clon A y los 10 aa siguientes en el clon B,
- ✓ p38-GFP, contiene 38 aa N-terminales de 3A, los cuales se encuentran en el clon A y el clon B, pero no en el clon C.
- ✓ p3A-GFP, contiene la proteína 3A completa fusionada a EGFP.

Se diseñaron los *primers* para las 4 construcciones. El clon p Δ 19-EGFP, se obtuvo con un *primer forward* (19.3A.NcoI.Fow) conteniendo los 19 aa de 3A y una secuencia de EGFP que hibridiza en el plásmido pEGFP-N1, utilizando el *primer* reverso GFP.Rev.HindIII. Este producto se obtuvo a una Ta de 40°, ya que el *primer*

19.3A.NcoI.Fow posee gran tamaño (84 nt) de los cuales solo 20 nt hibridizan en EGFP (Ver AnexoII).

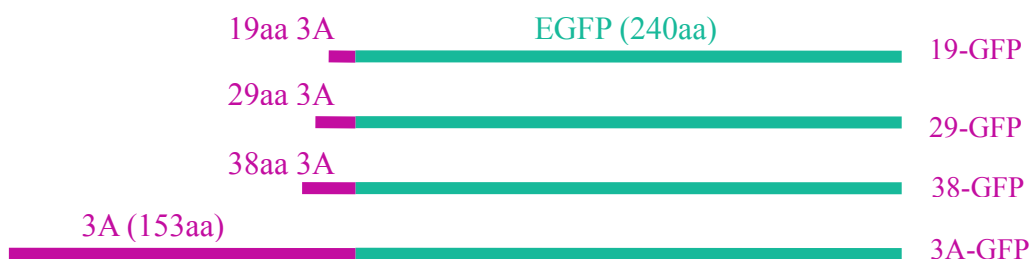


Figura 22. Esquema de péptidos de 3A fusionados a EGFP. Se utilizaron para evaluar el anticuerpo monoclonal anti-3A 3H7

Para el resto de las construcciones, se utilizó la técnica de PCR por solapamiento, ya que los segmentos a unir eran demasiado grandes para un solo primer. Por lo que se obtuvieron productos de PCR, desde el plásmido p3AF, con los siguientes juegos de *primers*: *3A.NcoI.FowA* y *Rev.29aa3A.GFP* (segmento 29aa, 111 pb, Ta: 45°C); *3A.NcoI.FowA* y *Rev.38aa3A.GFP* (segmento 38aa, 138 pb, Ta: 56°C); *3A.NcoI.FowA* y *Rev.3A.GFP* (segmento 3A; 459 pb, Ta: 56°C). Por otro lado, se amplificó EGFP, con el juego de *primers*, *GFP.Fow* y *GFP.Rev.HindIII* (720 pb, Ta: 40°C) (Ver AnexoII).

Los *primers* de los distintos segmentos N-terminales, comparten 24 nt con el primer *GFP.Fow*. Los distintos segmentos se separaron en un gel de agarosa 1,5%, los fragmentos se cortaron del gel y purificaron, se solaparon con el segmento de EGFP obtenido, a una Ta de 55°C por 30 seg, se amplificó a 68°C por 10 min y luego se agregaron los *primers* de los extremos (*3A.NcoI.FowA* y *GFP.Rev.HindIII*), y se obtuvo el producto final, con una Ta de 40°C. Los productos de PCR se purificaron.

Se prosiguió con el clonado, de cada uno de los productos finales, en el vector pET-30a, utilizando las ERs *NcoI* y *HindIII*, cuyos sitios de corte están incluidos en los *primers*. Los clones obtenidos, se analizaron por restricción y los candidatos se enviaron a secuenciar.

3.9. Transfección de células BHK-21 con ARN o ADN y Lipofectamina.

Se sembraron células BHK-21 en placas de 24 pocillos en la dilución necesaria para lograr el 70-80% de confluencia el día del experimento de transfección. Se prepararon las diluciones de los plásmidos de ADN o de ARN lineal a utilizar en medio Opti-MEM® (Invitrogen), a una concentración de 100ng/μl, con excepción de los

plásmidos pCAT7 (10 ng/μl) y pRen (2,5 ng/μl) por su baja concentración final. Luego se mezcló en un tubo por pocillo, las cantidades necesarias de cada plásmido, llevando a un Vf de 50 μl en Opti-MEM. En un tubo aparte, se adicionaron 3 μl de *Lipofectamine*® 2000 (Invitrogen) a 47 μl de Opti-MEM® por cada pocillo, se mezcló suavemente y se lo dejó reposar 5 min. Luego se agregaron 50 μl de esta última mezcla a cada tubo *ependorf* conteniendo los plásmidos o ARN, se mezcló suavemente y se lo dejó reposar 20 min.

Mientras tanto, se lavaron las monocapas celulares, dos veces, con 0,5 ml de medio DMEM libre de suero a temperatura ambiente (TA). Luego se reemplazó en cada pocillo el DMEM por 0,5 ml de Opti-MEM® 2% SFB en el de plásmidos de ADN, y en el caso de tranfecciones de ARN, se usó Opti-MEM® libre de suero. Se agregó la mezcla de *Lipofectamine*® 2000 y plásmidos o ARN en Opti-MEM® gota a gota en cada pocillo. La placa fue incubada a 37°C en estufa con 5% CO₂, por el tiempo necesario para cada experimento en particular. En algunos casos se reemplazó la mezcla de transfección a las 4 hs por medio DMEM con suero 2%.

3.10. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Inicialmente, antes de sembrar las células en placas de 24 pocillos, se agregaron a cada pocillo a utilizar, cubreobjetos circulares de 12 mm estériles. Las células se transfectaron cuando llegaron a la confluencia esperada, y pasadas las horas postranfección establecidas en cada caso, se procedió con la técnica de IFI.

Se lavó la monocapa de células, con 1 ml de PBS. Para la fijación se utilizaron 0,5 ml de Formaldehído 3,7% en PBS por 15 min a TA. Se finalizó la fijación con 0,5 ml Glicina 0,1M por 5 min a TA. Para permeabilizar las células, se utilizaron 0,5 ml de PBS-Tritón 0,2% (Tritón X-100) por 15 min a TA. Luego se lavó inmediatamente con 1 ml de PBS.

El bloqueo se realizó con 3% de BSA en PBS-Tritón (PBS-T-BSA) por 15 min a TA. Posteriormente, se incubó durante 1 h a TA con el anticuerpo primario disuelto en PBS-T-BSA (Vf 150 μl por pocillo) y se cubrió con un papel *parafilm* para evitar evaporación y el menisco que genera el líquido. Se hicieron 3 lavados con PBS por 5 min. Incubándose luego, con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor durante 1 h a TA, y cubriéndolo con papel *parafilm*. Nuevamente se lavó 3 veces con PBS por 5 min. Los núcleos fueron teñidos con DAPI o *TO-PRO*®-3 iodide (Thermo

Fisher Scientific), (según el microscopio utilizado) con una incubación de 15 min a TA (ver Anexo I). Se volvió a lavar 3 veces con PBS.

Para fijarlo a un portaobjetos, se utilizaron 5 μ l de *FluorSave™ Reagent* (Calbiochem). Se colocó la gota sobre el portaobjetos y se depositó el cubreobjetos con las células hacia el pegamento. Luego se mantuvo en oscuridad hasta secado del producto (al menos 10 min) para luego observar en microscopio de fluorescencia *Eclipse E600* (Nikon) o *Confocal Olympus FV-1000* (Instituto de Medicina Experimental).

Los anticuerpos utilizados fueron:

Monoclonal 3H7 anti-3A; monoclonal 2EII anti-3C; Anti-Flag®M2; Anti-mouse Alexafluor® 546; β -Tubulin Rabbit; Calnexinantibody; Anti-Giantinantibody; Anti-rabbit Alexafluor® 488 (Ver Anexo III).

3.11. Ensayos de medición de actividad de Luciferasa.

Los ensayos de medición de actividad de Luciferasa como gen reportero se realizaron utilizando el kit “*Dual-Luciferase® Reporter Assay System*” (Promega).

Las células para los ensayos de Luciferasa fueron sembradas en placas de 24 pocillos y transfectadas como se indicó anteriormente.

El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante, utilizando los lisados celulares, obtenidos con el *buffer* de lisis provisto, y se almacenaron a -80°C.

La medición de actividad se realizó en el luminómetro *BioTek FLX800*, utilizando una placa opaca específica para la medición de la actividad de Luciferasa (*LIA plate, 96 wells, White, flat bottom*, Greiner Bio One). Se mantuvo la placa envuelta en papel aluminio para protegerla de la luz. Las mediciones se realizaron en tandas de no más de 6 muestras por vez en el caso de Luciferasa de luciérnaga (*Firefly*) y de a 2 muestras por vez en el caso de Luciferasa de *Renilla* ya que su actividad desciende más rápidamente), para evitar que los tiempos de espera afecten las lecturas de los últimos pocillos. Los datos resultantes de la medición fueron almacenados y normalizados en plantillas de Excel®.

3.12. Expresión de proteínas en bacterias.

Para proceder con la expresión de proteínas se utilizaron bacterias BL21(DE3), por sus características genómicas, que permiten menor degradación del producto

proteico al ser deficiente en las proteasas *Lon* y *OmpT*. Las mismas fueron transformadas con el plásmido de interés, y crecidas en placas de LB agar con la resistencia adecuada. Se tomaron colonias individuales, en un ambiente estéril, y se crecieron en 1 ml de medio LB con antibiótico, durante toda la noche. Al día siguiente, se agregaron 19 ml más de LB al cultivo, y se creció aproximadamente 3 hs más, hasta obtener una DO entre 0,4 y 0,6. Luego se agregó IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 1M en una dilución 1:1000, y se creció durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 6000 rpm, durante 2 min en tubos eppendorf de 2 ml (2 veces), obteniendo 5 tubos eppendorf con un pellet de 4 ml de cultivo bacteriano en LB.

Se comprobó la presencia/ausencia de expresión, observando el peso molecular esperado de la proteína en SDS-PAGE y la detección por un anticuerpo específico mediante *Western Blot* (WB), evaluando además la acumulación en cuerpos de inclusión o sobrenadante. Para esto, pellets de aproximadamente 3 o 4 ml cada uno de los distintos cultivos en LB se resuspendieron en 200 μ l de PBS en presencia de inhibidor de proteasas (dilución 1:1000) (10mM PMSF, Phenylmethylsulfonylfluoride), y se sonicaron, manteniendo los tubos *eppendorf* en hielo, utilizando el ciclo de trabajo al 50% durante 15 seg y un control de salida de 3, repitiendo el proceso 3 veces con 15 segundos de descanso. El equipo que se utilizó fue el *Sonicator Cell Disruptor* (HeatSistem-Ultrasonics Modelo W-225R). Se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C. Se separaron el pellet y el sobrenadante para evaluar en WB.

3.13. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Alícuotas de los lisados bacterianos (pellet y sobrenadante), o de las muestras resultantes de la purificación de cuerpos de inclusión, fueron ajustadas a una concentración final 1X de buffer muestra. En todos los casos, las muestras fueron luego calentadas durante 5 min a 100°C. Las proteínas fueron separadas en las condiciones descritas por Laemmli (Laemmli, 1970) en geles de poliacrilamida al 10%, 12% o en geles separadores de dos pasos (8% en el superior y 12% en el inferior) de acuerdo al tamaño de la proteína analizada.

3.14. Tinción de proteínas con Coomassie Blue

Para ver expresión de la proteína de interés en bacterias, o para observar si la purificación de cuerpos de inclusión había sido eficiente, se utilizó esta técnica, en la cual, se incubó el gel de poliacrilamida, durante una hora con la solución *Coomassie Blue*, y luego se decoloró, con varios lavados, el segundo durante toda la noche, con la solución decolorante hasta ver el gel casi transparente nuevamente, y las proteínas teñidas del característico color azul. Se fotografió el gel o se escaneó para guardar la imagen.

3.15. Detección de proteínas mediante Western Blot

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE, fueron transferidas a una membrana *Hybond ECL Nitrocellulose* (GE Healthcare), que fue luego teñida con rojo Ponceau (1%) para evidenciar la presencia de las proteínas transferidas. Una vez lavada, la membrana se incubó durante 16 hs a 4°C en una solución de PBS 0,1% Tween-20 (PBS-T-0,1), conteniendo 5% de leche descremada. Posteriormente fue incubada con una dilución del anticuerpo primario en PBS-T-0,1, 3% de leche descremada (PBS-T-0.1-L), durante 1 h a TA. Luego de 3 lavados de 5 min con PBS-T-0,1, la membrana fue incubada con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (Promega) diluido en PBS-T-0.1-L, durante 1 h a TA (Ver Anexo I). Después de 3 lavados de 5 min con PBS-T, las proteínas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia (*Pierce Western Detection Reagent*®), exponiendo las membranas con placas AGFA CP-BU, o en el equipo G:Box (Chemi XRQ, Syngene).

Los anticuerpos utilizados fueron: Monoclonal 3H7 anti-3A; monoclonal 2EII anti-3C; *GFP Tag Polyclonal Antibody*; *Anti-mouse IgG HRP Conjugate*; *Goat anti-rabbit IgG-HRP*; *Horse radish peroxidase-conjugated goat anti-bovine serum*. (Ver Anexo III)

Los sueros bovinos fueron utilizados en dilución 1:200 y 1:50. Previamente incubados 1h en PBS-T-0.1-L junto con 50 ng/ml de los cuerpos de inclusión del control negativo (GFP.GST).

3.16. Purificación de cuerpos de inclusión.

Para la obtención de la proteína con mayor concentración y pureza, se llevó a cabo la purificación de cuerpos de inclusión. Para lo cual, se realizó previamente la expresión

de la proteína como fue descrita y posteriormente se centrifugó el cultivo a velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$).

Se resuspendió el pellet bacteriano en 1:50 del volumen inicial de LB, en Solución 1 (ver Anexo I) y se realizó un lavado, se centrifugó 5 min a $V_{m\acute{a}x}$, y se volvió a resuspender en Solución 1. Nuevamente se centrifugó 5 min a V_{max} . Se resuspendió el pellet en 6% del volumen inicial en Solución 1 + DOC. Se incubó 10 min a TA. Se centrifugó 5 min a V_{max} . Se resuspendió en 6% del volumen inicial en Solución 1+Tritón. Se centrifugó 10 min a V_{max} y se lavó el pellet 3 veces con Agua MiliQ. Se resuspendieron los cuerpos de inclusión en Urea 6M.

3.17. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Para cuantificar los cuerpos de inclusión purificados se utilizó la técnica de Bradford mediante el kit *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad), adaptado a pequeños volúmenes.

Se realizó una curva estándar de la proteína BSA (seroalbúmina bovina) realizando diluciones al medio, obteniendo las siguientes concentraciones: 400 ng/ μ l, 200 ng/ μ l, 100 ng/ μ l, y 50 ng/ μ l. Cada 40 μ l de dilución se agregó 10 μ l del reactivo.

En el caso de las muestras, se midieron 2 μ l de muestra (o 1 μ l si estaba muy concentrada) diluida en 38 μ l de agua, a lo que se le agregaron los 10 μ l del reactivo.

La curva y las muestras se midieron a 595 nm en el equipo *Nanodrop*, y se calcularon las concentraciones de las muestras incógnitas.

3.18. ELISA

Se realizaron ELISAs indirectos y *sandwich* indirectos.

Los anticuerpos utilizados fueron: *Anti-mouse IgG HRP Conjugate*; *Goat anti-rabbit IgG HRP Conjugate*; *goat anti-bovine serum HRP Conjugate*; *anti GFP Polyclonal Antibody*; anticuerpo monoclonal 3H7 anti-3A (Ver Anexo III).

Otros reactivos usados para la técnica fueron: placas para ELISA, *Microlon 96wells "highbinding"* (Griner Bio-one), solución de captura, PBS-T0,05, Solución Dilución (SD), Solución dilución leche (SDL), ABTS, H_2O_2 , Solución *Stop* (Ver Anexo I). La absorbancia fue medida a 405nm o 415nm.

3.18.1. 3AGFP-ELISA

Los pocillos se incubaron toda la noche a 4°C en solución de captura, conteniendo cada uno 50µg de cuerpos de inclusión (3A-GFP o GFP-GST). Luego se bloqueó utilizando SDL, 1h a 37°C. Se hicieron 2 lavados con PBS-T0,05, y se agregaron los sueros, en las diluciones correspondientes para cada caso. Se incubó por 1h a 37°C, se realizaron 4 lavados y se agregó el anticuerpo conjugado anti-bovino (Anexo III), se incubó 1h a 37°C. Se volvió a lavar 4 veces, y se reveló con ABTS/H₂O₂.

Para cada pocillo a evaluar se le restó a su DO absoluta, la DO absoluta del control GFP-GST obteniendo la DO neta, para cada caso.

3.18.2. 3ABC-ELISA

Se utilizó el Kit de ELISA para medición de anticuerpos contra la poliproteínaNC3ABC del virus de la fiebre aftosa en bovinos (K-3ABC-BOV) (ICT Milstein-CONICET).

Las placas de ELISA fueron sensibilizadas utilizando como captura el anticuerpo monoclonal 3H7, diluido en *buffer* carbonato-bicarbonato. Como antígeno se usó el péptido 3ABC recombinante. Cada muestra de suero en dilución 1:40 se añadió a dos pocillos (con y sin antígeno 3ABC). La detección del anticuerpo unido se realizó agregando IgG anti-bovino conjugada con peroxidasa y como sustrato ABTS/H₂O₂. Cada placa fue validada y leída en un lector automático de ELISA a 405nm.

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante (ICT Milstein- CONICET). Los resultados se expresaron como:

$$\text{OD neta} = (\text{OD con Ag}) - (\text{OD sin Ag})$$

$$\% \text{ muestra} = (\text{OD neta muestra} \times 100) / (\text{OD neta control positivo})$$

Los criterios de aceptación de resultados, que se aplicaron individualmente a cada placa son:

✓ **Control positivo (C+):** La media de las absorbancias del control positivo debe ser mayor de 0,500, y mayor a 3 veces la media de las absorbancias del control negativo. Este control, pertenece al suero de un ejemplar bovino vacunado con cuerpos de inclusión conteniendo la proteína 3ABC. Practica llevada por el laboratorio de producción de kits, y comparado con el control positivo inicial, utilizado en la publicación del ELISA 3ABC (Robiolo y cols., 2006).

✓ **Control negativo(C-):** Pool de sueros animales obtenidos de un área libre de aftosa sin vacunación de Argentina.

✓ El resto de los sueros controles deben estar en el rango de aceptación.

Ctrol C3-4: 48% a 122%

Ctrol Q2: 2.4% a 27%

Ctrol Q8: 6% a 30%

Ctrol P+: 33% a 74%

Ctrol Negativo (C-): 0% a 5%

Incluyendo los controles positivos, al menos 5 de los 8 controles deben ser válidos (C3-4, P+, Q2, Q8 y duplicados de C+ y C-).

✓ Valores de Corte:

Menor de 15%: Negativo

Entre 15% y 19.9%: Sospechoso

Igual o mayor a 20%: Positivo.

3.18.3. Sueros Bovinos Utilizados.

Se utilizaron 363 sueros bovinos, de los cuales, 8 pertenecían a bovinos sanos no vacunados (*naïve*), 355 animales sanos vacunados de campo procedentes de la cuenca del Salado, Buenos Aires, Argentina, compuestos por terneros (1 ronda de vacunación), vaquillonas (dos rondas de vacunación) y mayores (más de dos rondas de vacunación), los cuales llegaron al instituto para su análisis en 2014-2016.

Como controles positivos, dos positivos débiles, Q2 y Q8 los cuales fueron obtenidos de Internegocios en el año 2003/4 (posterior al brote del año 2001). Y también se cuenta con los sueros 191 y 491, categorizados también como positivos débiles.

El suero C+, como se mencionó anteriormente, es un suero obtenido por inyección de 3ABC recombinante en un ejemplar bovino, obtenidos de cuerpos de inclusión sin purificar, que se utiliza de rutina en el kit 3ABC-ELISA.

Los sueros conv5, 5+, C6-7 y C3-4 son provenientes de animales infectados en Entre Ríos recibidos en enero 2002. Y el suero P+ también es un positivo confirmado. Todos los sueros caracterizados como positivos, o positivos débiles, fueron analizados por 3ABC-ELISA y confirmados por EITB (Ver Tabla 1, Resultados).

Resultados

4. Resultados.

Capítulo I:

Estudios sobre la proteína 3A del Virus de la Fiebre Aftosa.

4.1. Puesta a punto del ensayo de replicación del ARN viral con el replicón derivado del VFA que expresa el gen reportero Luc

- ✓ Obtención de un replicón (pRep) funcional
- ✓ Obtención de un replicón no funcional (pRepD) como control negativo de la replicación.
- ✓ Análisis comparativo de la transfección del replicón como ADN plasmídico o como ARN transcripto *in vitro*.
- ✓ Puesta a punto de las variables del sistema análogo de replicación/transcripción.

4.1.1. Transfecciones de células BHK-21 con pRep.

Una vez obtenido el clon pRep y confirmada su secuencia correcta, se procedió a ensayar su funcionalidad en células BHK-21.

Se realizó una midipreparación de ADN para obtener cantidad suficiente del mismo, y se linealizó el plásmido con la ER *EcoRV*, ubicada en el extremo 3' luego del tracto de poli(A), la cual genera extremos romos. Se purificó el ADN lineal y se realizó la transcripción *in vitro*. El ARN resultante fue posteriormente purificado, se fraccionó en alícuotas y se guardó a -80°C.

Se transfectaron células BHK-21, sembradas en placas de 12 pocillos con 2µg de ARN procedente de pRep con Lipofectamina. Se recolectaron lisados celulares a 1, 8, 24, 50, 74, 97 y 120 hs post transfección (hpt), con el fin de evaluar la actividad de Luciferasa (Figura 23).

Una vez corroborada la actividad de pRep, se continuó con el diseño de un Replicón defectivo en la replicación, para poder diferenciar transcripción de replicación.

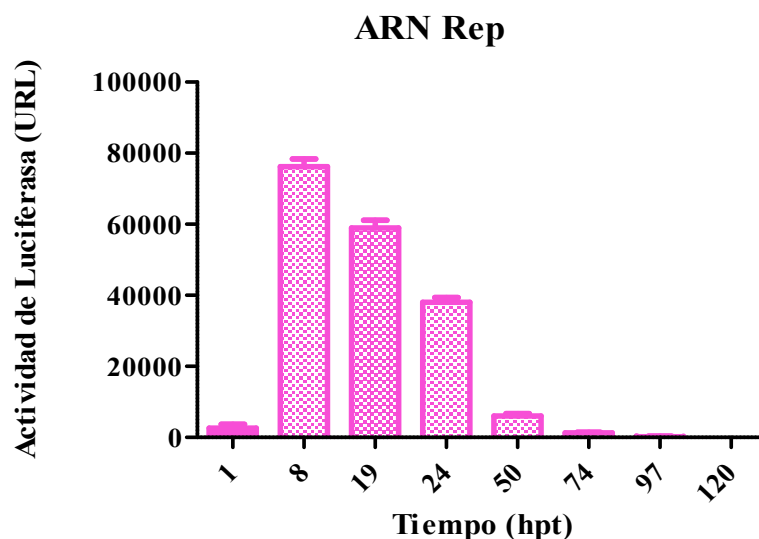


Figura 23. Actividad de Luciferasa de pRep en función del tiempo. Células BHK-21 cultivadas en placas de 12 pocillos fueron transfectadas con 2 μ g de ARN por pocillo, por duplicado. Las células fueron lisadas a 1, 8, 19, 24, 50, 74, 97 y 120 hs post transfección (hpt). Los datos corresponden a al promedio y desviación estándar de valores absolutos expresados en Unidades Relativas de Luz (URL)

4.1.2. Evaluación del Replicón Defectivo 1 (pRepD1).

Se transfectaron nuevamente monocapas de células BHK-21, sembradas en placas de 12 pocillos, con 2 μ g de ARN de pRep y pRepD1, y se recolectaron lisados a tiempos cortos, para evaluar si había algún pico de expresión del gen Luc antes de las 8 hpt (Figura 24).

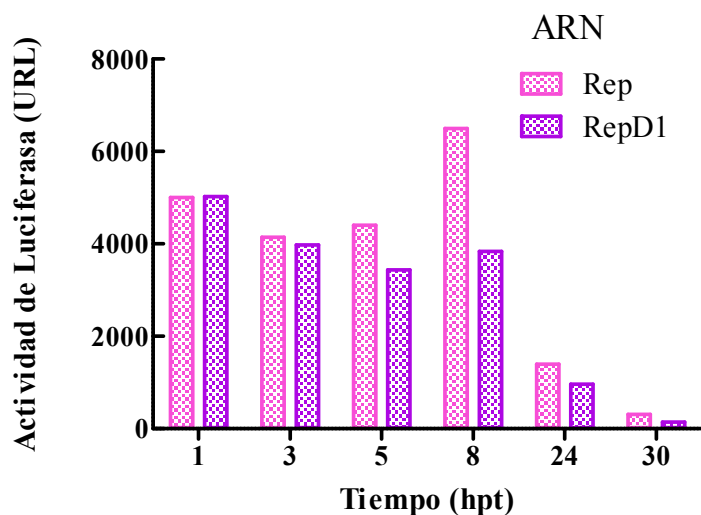


Figura 24. Actividad de Luciferasa de luciérnaga de pRep y pRepD1, en función del tiempo. Medición en lisados de células BHK-21 transfectadas con ARN de ambos plásmidos a distintos tiempos. Células BHK-21 cultivadas en placas de 12 pocillos fueron transfectadas con 2 μ g de ARN por pocillo de Rep o RepD1. Las células fueron lisadas a las 1, 3, 5, 8, 24 y 30 hpt. Los datos corresponden a valores absolutos expresados en Unidades Relativas de Luz (URL)

Se observó que si bien la replicación disminuía en el caso de pRepD1, no lo hacía en el grado esperado. Por otro lado, la actividad de Luciferasa total fue baja en este experimento. Se comprobó la integridad del ARN de ambos plásmidos en un gel de agarosa en condiciones libres de ARNasas y se visualizaron dos bandas nítidas, mostrando que no se encontraba degradado.

Para reducir los riesgos de degradación se ensayó a continuación la transfección directa con ADN, con el objetivo que la transcripción tuviera lugar dentro de las células.

4.1.3. Evaluación comparativa de la transfección de ARN o ADN.

Teniendo en cuenta que el análogo del genoma del VFA se encuentra regulado por el promotor de T7pol, y que la transcripción es independiente de *cap*, existen dos opciones para la transfección del mismo: a) utilizar ARN transcripto *in vitro* a partir de la construcción plasmídica, o b) trasfectar la construcción plasmídica junto con un plásmido que expresa la T7pol (pCA-T7). De ambas formas la replicación del pRep se determina indirectamente evaluando la actividad del gen reportero.

Se transfectó el plásmido pRep, junto con el plásmido pCA-T7, de modo que el proceso de transcripción de ADN a ARN se llevara a cabo intracelularmente con el fin de evaluar si se obtenía un mejor rendimiento.

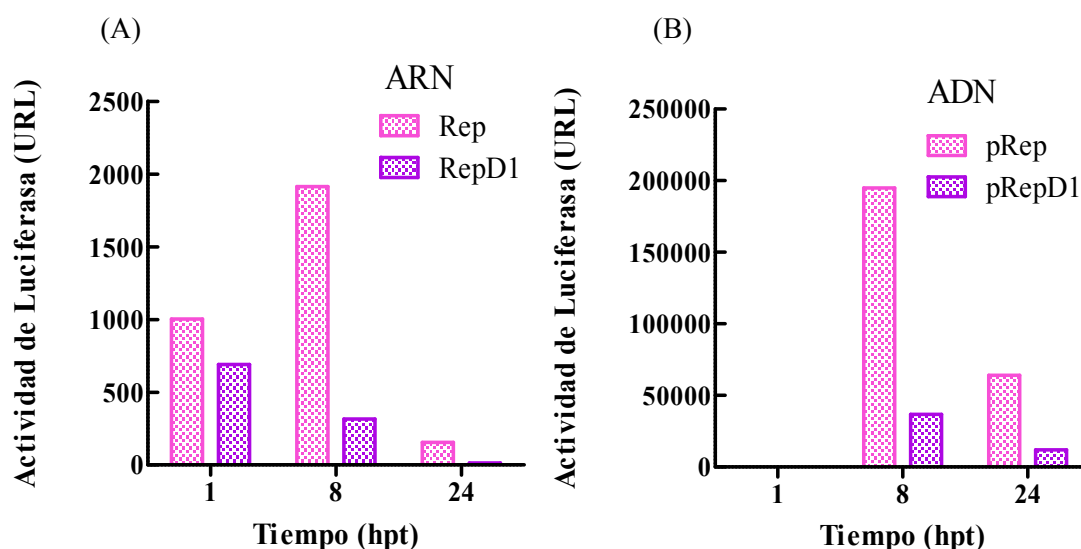


Figura 25. Evaluación de actividad de Luciferasa luego de transfección con ARN o ADN. Células BHK-21 cultivadas en placas de 24 pocillos fueron transfectadas con 1 µg de ARN o ADN por pocillo. Las células fueron lisadas a las 1, 8, y 24 hpt. Los datos corresponden a los valores absolutos expresados en Unidades Relativas de Luz (URL).

(A) ARN transcripto de Rep y RepD1; (B) Cotransfección de ADN plasmídico de pRep o pRepD1 + pCA-T7. Nota: Los resultados están graficados en diferentes escalas.

Se transfectaron en este caso monocapas de células BHK-21, sembradas en placas de 24 pocillos, con 1 µg de ARN o 1 µg de ADN más 0,5 µg de pCA-T7 (Figura 25).

Como resultado se obtuvo una mayor actividad de Luciferasa en el caso de la transfección con ADN plasmídico, por lo cual, se decidió utilizar esta metodología en los experimentos siguientes, cotransfectando con los plásmidos (pRep y mutantes), junto con pCA-T7.

4.1.4. Determinación de la concentración óptima de ADN para las transfecciones.

Para determinar la mejor concentración de ADN a utilizar, se transfectaron monocapas de células BHK-21 sembradas en placas de 24 pocillos, por duplicado, con las siguientes concentraciones de plásmidos pRep y pRepD1: 0,25 µg, 0,5 µg y 1 µg. En todos los casos se utilizaron 0,5 µg de pCA-T7 y se lisaron las células a las 8 hpt. Se graficaron las medias y desvíos estándar de los valores obtenidos por medio de la medición de actividad de Luciferasa de luciérnaga (URL) luego de restar el *mock* de las células sin transfectar (Figura 26).

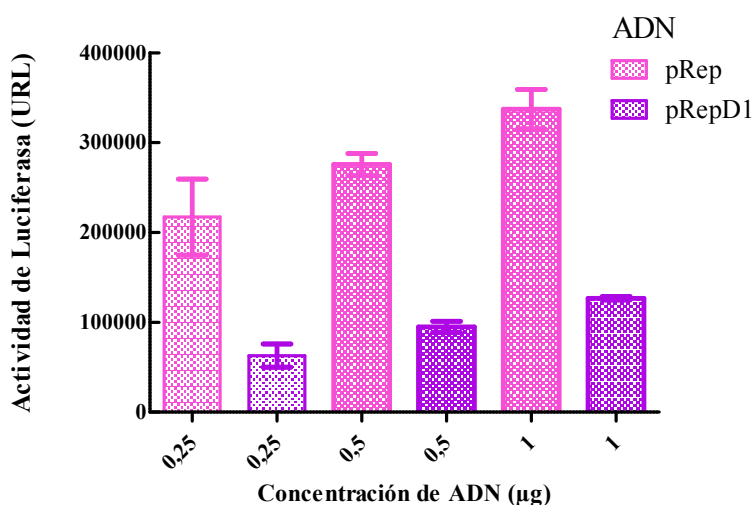


Figura 26. Determinación de la concentración de ADN óptima. Células BHK-21 cultivadas en placas de 24 pocillos fueron transfectadas con 0,25, 0,5 y 1 µg de ADN por pocillo. Las células fueron lisadas a las 8 hpt. Los datos corresponden a la media y desviación estándar de los valores absolutos expresados en Unidades Relativas de Luz (URL).

Se eligió la concentración de 0,5 µg de ADN por pocillo en placas de 24 para los experimentos subsiguientes, dado que se obtuvo una actividad de Luciferasa tres veces superior al control defectivo (pRepD1), con la utilización de menor cantidad de material.

4.1.5. *Uso de Luciferasa Renilla como normalizador de la Actividad Luciferasa.*

Para poder normalizar la medición de la actividad de Luciferasa de luciérnaga (*firefly*) y de esa manera desestimar variaciones metodológicas inter-muestra, se decidió cotransfectar con un plásmido que expresa Luciferasa *Renilla* en cantidad constante, todos los pocillos utilizados en los experimentos. De esta manera utilizando el kit dual (Dual-Luciferase® ReporterAssaySystem) que mide la actividad de ambas Luciferasas, *Renilla* y de Luciérnaga en la misma muestra, se pueden normalizar las mediciones.

Se probaron dos plásmidos pTM1-Renilla (expresa Renilla bajo el promotor T7ARNPol) y pRL-CMV (expresa Renilla bajo el promotor CMV), en idéntica concentración. Para ello se tranfectaron células BHK-21 con 0,5µg de los plásmidos pRep, pRepD1 o pEGFP-N1 (*mock*) junto con 0,5µg de pCA-T7, y 0,05 µg los plásmidos de pTM1-Renilla o pRL-CMV. Los lisados celulares se recolectaron a las 8 hpt.

Para normalizar los datos, la actividad de Luciferasa de luciérnaga, expresada en URL (emitida por la actividad de pRep y pRepD1) se dividió por la actividad de Luciferasa de *Renilla*, también en URL, y el resultado se expresó como Diferencia de Actividad. Este cálculo se realizó para todos los pocillos evaluados, incluidos los *mocks* de células, que contienen Luciferasa de *Renilla*, pero no de Luciérnaga. (Figura 27).

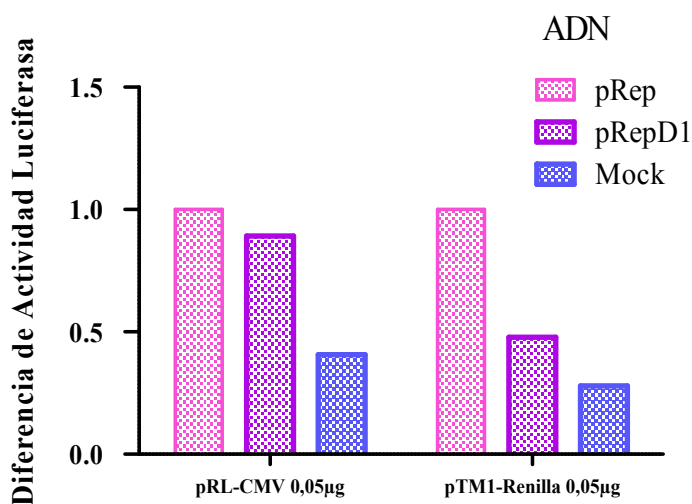


Figura 27. Elección del plásmido de Luciferasa *Renilla* para normalizar. Células BHK-21 cultivadas en placas de 24 pocillos fueron transfectadas con 0,5µg de ADN pRep o pRepD1 por pocillo, más 0,5 µg de pCA-T7. Las células fueron lisadas a las 8 hpt. Los valores son representados como Diferencia de Actividad de Luciferasa.

Se eligió el plásmido pTM1-Renilla, ya que contiene el mismo promotor que los plásmidos Replicones, y además porque se obtuvo mayor diferencia entre pRep y pRepD1.

Se realizaron experimentos posteriores para bajar aún más la concentración de pTM1-Renilla a transfectar, probando concentraciones de 0,005 μ g, 0,0025 μ g y 0,001 μ g, debido a que aún se obtuvieron valores muy altos en las mediciones. Finalmente, se optó por utilizar 0,0025 μ g, aunque da también valores altos, para evitar el error por pipeteo con concentraciones menores.

4.1.6. Evaluación de otros plásmidos defectivos (pRepD2 y pRepSD).

Dado que se obtuvieron valores positivos relativamente elevados con pRepD1, el cual solamente debiera transcribir y por consiguiente obtenerse valores inferiores, se decidió evaluar otras versiones defectivas de pRep. Se contaba con una versión de pRep que posee una delección puntual en la proteína 2B (G4120), que provoca el corrimiento del marco de lectura, truncando la secuencia de aa hacia el carboxilo terminal; este se denominó Defectivo 2 (pRepD2). Luego se construyó otro vector, que se denominó pRepSuperDeletado (pRepSD) (Figura 14 M&M), al cual se le eliminó gran parte del genoma viral, dejando solo la secuencia de Luciferasa de Luciérnaga, para asegurar que no tuviera ninguna posibilidad de replicar.

Se transfectaron los replicones de igual tamaño (pRep, pRepD1 o pRepD2) con 0,5 μ g de ADN por pocillo, mientras que para pRepSD se utilizaron 0,3 μ g de ADN, junto con 0,05 μ g de pCA-T7 y 0,0025 μ g de pTM1-Renilla. (Figura 28). Los valores son representados como Diferencia de Actividad de Luciferasa. Se tuvo en cuenta los tamaños de los Replicones, calculando la transfección con idéntica cantidad de moléculas de cada uno.

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad, utilizando el estadístico Test de Student con un nivel del 99% de confianza.

Los resultados indican que pRepD2 y pRepSD no presentan actividad replicativa (pRep vs pRepD2 $p=0.0039$; pRep vs pRepSD $p=0.004$; pRepD2 vs pRepSD $p=0.97$; pRepD2 vs *mock* Renilla $p=0.42$). pRepD1 conserva cierta funcionalidad (pRep vs pRepD1 $p=0.58$, no significativo), por lo que se descarta como control.

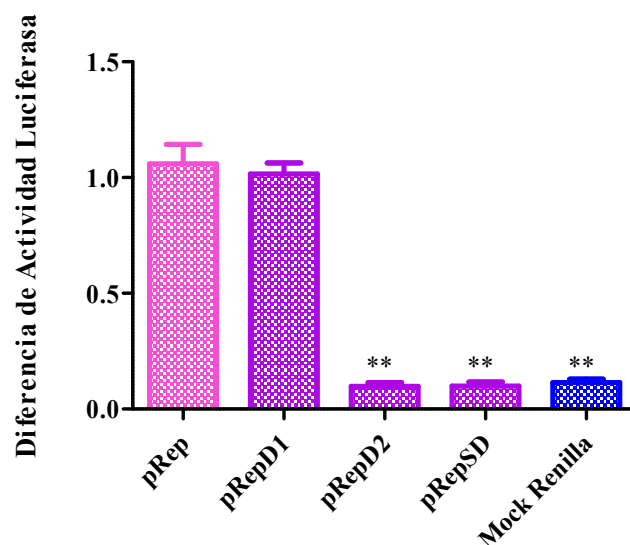


Figura 28. Ensayo de los Replicones Defectivos. Cotransfección en células BHK-21, con los plásmidos pRep o sus mutantes defectivos (ver μg en el texto), junto con pCA-T7 (0,05 μg), y pTM1-Renilla (0,0025 μg), lisadas a las 16 hpt. Los valores son representados como Diferencia de Actividad. ** $p < 0.01$ Test de Student con un 99% de confianza.

Asimismo, se asume que la luminiscencia total de pRep corresponde a la sumatoria de la transcripción inicial producida por T7pol y la proveniente de la replicación inducida por el complejo de las proteínas virales no estructurales codificadas en el Replicón. Por lo tanto la diferencia de luminiscencia obtenida entre pRep y pRepD2 daría idea de la eficiencia de replicación por medio de las proteínas virales de pRep. A partir de esta puesta a punto, se continuó con los experimentos eligiendo las mejores condiciones para las variables evaluadas. Se utilizaron 0,5 μg de ADN para el plásmido pRep y sus mutantes, 0,05 μg de pCA-T7, 0,0025 μg de pTM1-Renilla y los lisados fueron obtenidos a las 16 hpt. Esta última condición se fijó por temas operativos, ya que la medición de Luciferasa fue similar que a las 8 hpt.

4.2. Identificación en 3A de dominios involucrados en la replicación a través de mutagénesis dirigida.

- ✓ Construcción de mutantes de la proteína 3A con deleciones parciales en la región amino terminal en el replicón pRep para evaluar el efecto en la eficiencia de replicación.
- ✓ Construcción de mutantes puntuales diseñadas en base a los resultados obtenidos con las mutantes de deleción.

4.2.1. Evaluación de mutantes de la proteína 3A con deleciones parciales en la región N-Terminal.

Para el análisis de la región N-terminal de 3A, se diseñaron tres mutantes de pRep que presentan deleciones en la región N-terminal de la proteína NC 3A. Las mismas fueron nombradas en según los aminoácidos que fueron eliminados: pRep Δ 6-11, pRep Δ 6-17 y pRep Δ 6-23 (Figura 15 M&M). Estas construcciones poseen todas las proteínas virales necesarias para la replicación.

Se realizó un experimento con los plásmidos pRep Δ 6-11, pRep Δ 6-17 y pRep Δ 6-23, utilizando pRep y pRepD2 como controles de replicación y pTM1-Renilla como normalizador, en las condiciones ya descritas. En la Figura 29 se muestran los resultados de 3 experimentos independientes, en donde cada condición se realizó por duplicado. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad, utilizando el estadístico Test de Student con un nivel del 99% de confianza.

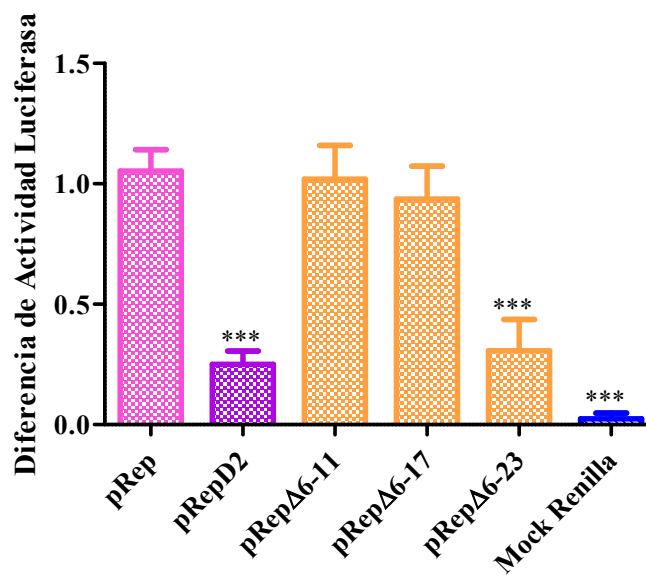


Figura 29. Diferencia en la actividad Luciferasa de replicones portando las deleciones en la región N-terminal de 3A. Células BHK-21 cotranfectadas siguiendo las condiciones del Sistema Replicón. Los valores son representados en media y DS como Diferencia de Actividad Luciferasa. Los asteriscos señalan las diferencias significativas con el replicón con 3A wt. *** $p < 0,0001$ Test de Student con un 99% de confianza.

Las mutantes pRep Δ 6-11 ($p=0,62$) y pRep Δ 6-17 ($p=0,1$) presentaron actividades de Luciferasa similares a pRep, sugiriendo que la región comprendida entre los aminoácidos 6 a 17 de 3A no sería indispensable para la funcionalidad del mismo.

Por el contrario, pRep Δ 6-23 presentó una marcada disminución en dicha actividad ($p < 0,0001$), indicando un probable requerimiento de los aminoácidos 18 a 23 de 3A para la replicación.

4.2.2. Evaluación de mutantes en la región N-terminal de 3A.

Para identificar aminoácidos responsables de la disminución de la actividad de pRep en la región definida entre las posiciones 18 a 23 de la proteína 3A, se diseñaron dos replicones con mutaciones dentro de dicha región.

Para el primer mutante, se reemplazaron los aminoácidos de las posiciones 18, 19 y 20 por el aminoácido alanina, dado que las ubicaciones 23 y 24, ya las poseen. Este clon fue denominado pRepQ18A/H19A/E20A. Por otro lado, se construyó un segundo clon con una sola mutación, con el objetivo de reemplazar solo el aminoácido con mayor carga de la zona, el ácido glutámico (E) en la posición 20 de la proteína. Este mutante se denominó pRepE20A (Figura 17, M&M).

Secotransfectaron células BHK-21, con ADN purificado de los plásmidos pRep Δ 6-23, pRepQ18A/H19A/E20A o pRepE20A cada uno junto con pCA-T7 ypTM1-Renilla en las condiciones anteriormente descritas. Se utilizó pRep y pRepD2 como control positivo y negativo, respectivamente. Las células se lisaron 16 hpt (Figura 30.).

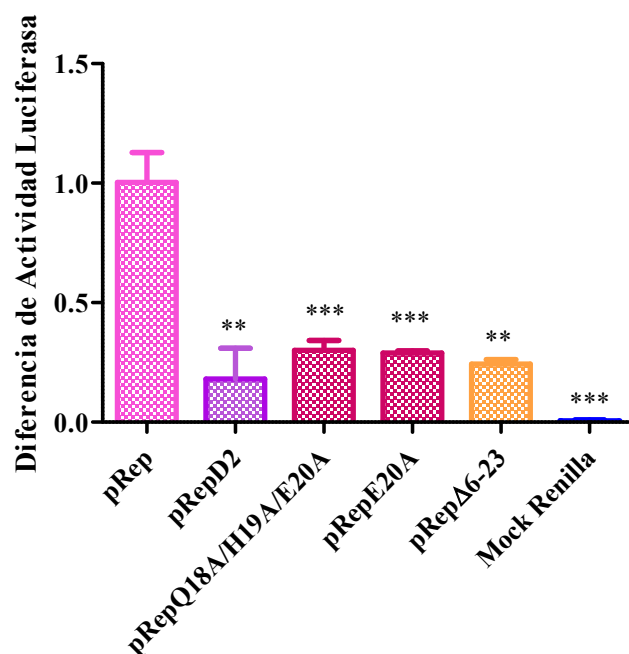


Figura 30. Evaluación de las mutantes puntuales en las posiciones aminoacídicas 18-19-20 en el N-terminal de 3A. Células BHK-21 cotransfectadas siguiendo las condiciones del Sistema Replicón. Los valores representan la media y DS, como Diferencia de Actividad Luciferasa. Los asteriscos señalan las diferencias significativas con el replicón con 3A *wt*. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ Test de Student con un 99% de confianza.

Los valores p obtenidos comparando cada mutante con el control pRep fueron: pRepD2, $p=0,0014$; pRepQ18A/H19A/E20A, $p=0,0008$; pRepE20A, $p=0,0006$; pRep Δ 6-23, $p=0,0039$; *mock*, $p=0,0002$. Todos son significativamente diferentes a pRep.

En ambos casos, tanto con Q18A/H19A/E20A como con E20A, se observó una disminución significativa de la actividad de Luciferasa, similar al de la delección completa Δ 6-23 en 3A. Por lo que en la región comprendida entre los aminoácidos 18-23 el ácido glutámico en la posición 20, resultarían necesarios para la replicación en el contexto del replicón.

4.2.3. Construcción de una mutante en la región propuesta como, transmembrana de la proteína no estructural 3A.

Para corroborar como afecta la zona propuesta como transmembrana (Gonzalez-Magaldi y cols., 2014) en la replicación, se construyó una mutante sobre pRep, reemplazando esta región por una secuencia de 8 alaninas consecutivas, la cual se denominó pRep Δ TM.

Se transfectaron células BHK-21 con pRep Δ TM o pRepE20A junto con pCA-T7 y pTM1-Renilla. pRep y pRepD2 se incluyeron como control positivo y negativo, respectivamente. Las células se lisaron a las 16 hpt. (Figura 31).

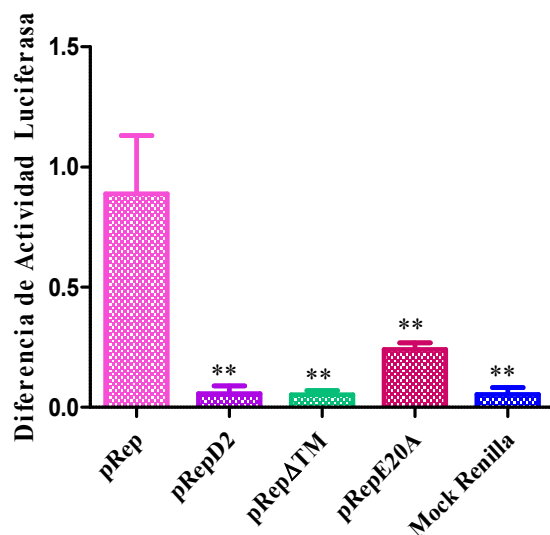


Figura 31. Actividad de Luciferasa de la mutante pRep Δ TM. Se muestra la actividad de la mutante con una delección total de la zona predicha transmembrana (pRep Δ TM), comparada con la mutante puntual pRepE20A. Células BHK-21 cotransfectadas siguiendo las condiciones del Sistema Replicón. Los valores representan la media y DS, como Diferencia de Actividad Luciferasa. Los asteriscos señalan las diferencias significativas con el replicón con 3A *wt*, analizado mediante el Test de Student, 99% de confianza. ** $p < 0,01$

Los valores p obtenidos comparando cada mutante con el control son:

pRepD2, $p= 0,0041$; pRep Δ TM, $p=0,0039$; pRepE20A, $p=0,01$; *mock*, $p=0,004$, indicando que las diferencias en la actividad Luciferasa son significativas.

Este experimento permitió observar que la proteína 3A sin su zona hidrofóbica es totalmente disfuncional, y anula la replicación de ARN, mientras que la mutante puntual pRepE20A, aunque posee una drástica disminución en la actividad replicativa, ésta no es total

4.2.4. Clivaje del factor celular eIF4G

Para analizar un parámetro diferente a la actividad de pRep y sus mutantes, la observación de la presencia de las PNC del VFA por WB sería una alternativa. Pese a reiterados intentos, utilizando distintas concentraciones de pRep (1 μ g y 2 μ g) y distintos anticuerpos (anti-3A 3H7, anti-3C), no se obtuvieron resultados positivos, posiblemente debido a que la técnica no es suficientemente sensible para detectar la cantidad de proteínas NC producidas por el replicón.

Alternativamente se probó utilizar la capacidad reportada de la proteína no estructural Lpro del VFA para clivar el factor de transcripción eIF4G. Este clivaje favorece las vías de traducción mediadas por IRES y disminuye la traducción de mensajeros celulares (Belsham, 2005; Steinberger y Skern, 2014).

Para corroborar el clivaje del factor eIF4G, luego de transfección con los distintos mutantes, se realizó una corrida en un gel separador de dos pasos (8% y 12%) y luego un Western blot con anticuerpos anti-eIF4G y anti-actina (Ver Anexo III) (cortesía del equipo de la Dra. Nora Lopez). El factor eIF4G posee un peso molecular de 220 KDa, y la actina de 42 KDa (Figura 32).

Se observa que el clivaje del factor eIF4G, donde se produce, es parcial. Esto concuerda con los resultados mostrados por Tulloch y colaboradores, quienes hacen una curva de tiempo transfectando con replicones conteniendo la proteína Lpro, en la cual el factor eIF4G aparece clivado en mayor cantidad entre las 1 a 6 hpt, y luego disminuye (Tulloch y cols., 2014). En este trabajo, los lisados son recobrados a las 16 hpt.

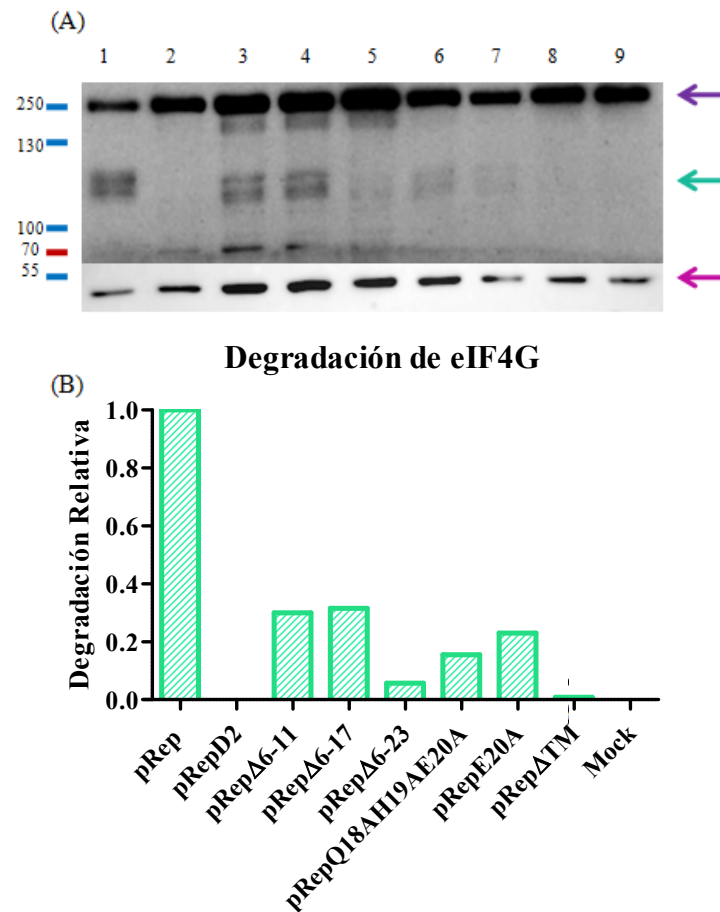


Figura 32. Clivaje del factor eIF4G. (A) Western Blot de lisados de células BHK-21 transfectadas con los siguientes plásmidos: calle 1, pRep; calle 2, pRepD2; calle 3, pRepΔ6-11; calle 4, pRepΔ6-17; calle 5, pRepΔ6-23; calle 6, pQ18A/H19A/E20A; calle 7, pE20A; calle 8, pRepΔTM y calle 9, *mock* Renilla. La zona superior de la membrana fue revelada con anti-eIF4G, y la zona inferior con anti-actina. La flecha violeta marca el factor eIF4G entero y la flecha verde, el factor clivado. La flecha inferior (rosa) señala la actina. El marcador de peso molecular está expresado en KDa. (B) Normalización del factor eIF4G clivado con respecto a actina, utilizando el programa ImageJ.

4.3. Identificación de dominios de la proteína 3A involucrados en la asociación a membranas internas o al citoesqueleto celular.

- ✓ Construcción de un plásmido que contenga 3A unida la etiqueta “*Flag*”, para evaluar la ubicación intracelular de la proteína.
- ✓ Introducción de los mutantes de deleción y mutantes puntuales de la proteína 3A estudiados en el Objetivo 2.
- ✓ Evaluación de cambios en la asociación a membranas internas de las mutantes mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) luego de transfección de células BHK-21.
- ✓ Evaluación de cambios en la asociación a membranas internas de una mutante de deleción en la región hidrofóbica en el marco del replicón pRep.

4.3.1. Evaluación de la ubicación intracelular de 3A y sus mutantes.

Se construyeron plásmidos conteniendo la secuencia de la proteína 3A^{wt} y de las mutantes de delección estudiadas anteriormente, fusionadas a la etiqueta *Flag* (F) y/o al gen EGFP. Los plásmidos se denominaron: p3AF, pΔ6-11F, pΔ6-17F, pΔ6-23F, pΔTMF, pEGFP[3A] y pEGFP[3AF].

Para comparar la ubicación de EGFP, con respecto a la fusión 3A-EGFP, en primer lugar células BHK-21 fueron transfectadas con 1 µg de plásmido, y fijadas a distintos tiempos. Se procedió a realizar IFI, con el anticuerpo primario anti-*Flag*, y el secundario conjugado con Alexa Fluor®. Los núcleos se tiñeron con DAPI. En la Figura 33, se observa el control de transfección expresando EGFP, por transfección del plásmido pEGFP-N1, y observación directa de fluorescencia.

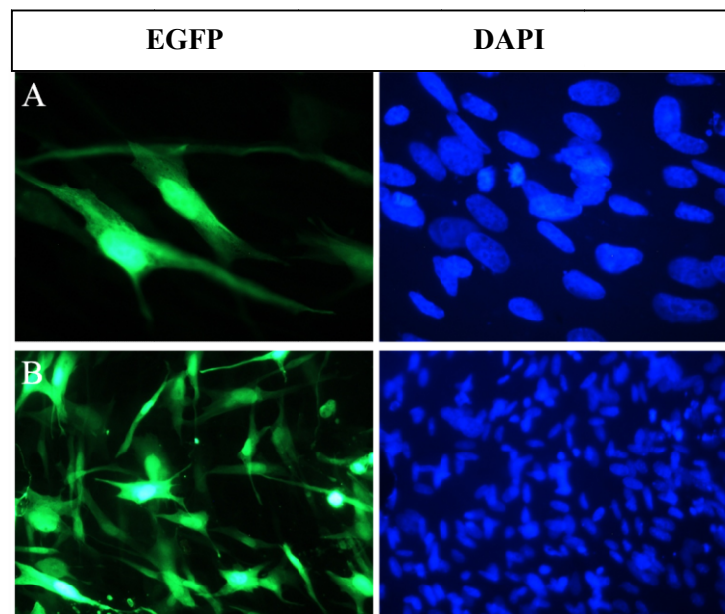


Figura 33. Expresión de EGFP. Imágenes de microscopía de fluorescencia. Células BHK-21 transfectadas con el plásmido pEGFP-N1, emisión directa de EGFP a 24 hpt. Núcleos teñidos con DAPI. (A) 10000x y (B) 4000x.

Para observar la ubicación celular de las fusiones de 3A, células BHK-21 se transfectaron con los plásmidos p3AF, pEGFP[3A] o pEGFP[3AF], se fijaron a las 24 hpt y revelaron con anti-*Flag* y Alexa Fluor®. En la Figura 34 se observa en ambos casos (paneles B y C, centro), la expresión de EGFP fuera del núcleo, y formando gránulos, probablemente debido a la fusión con la proteína 3A.

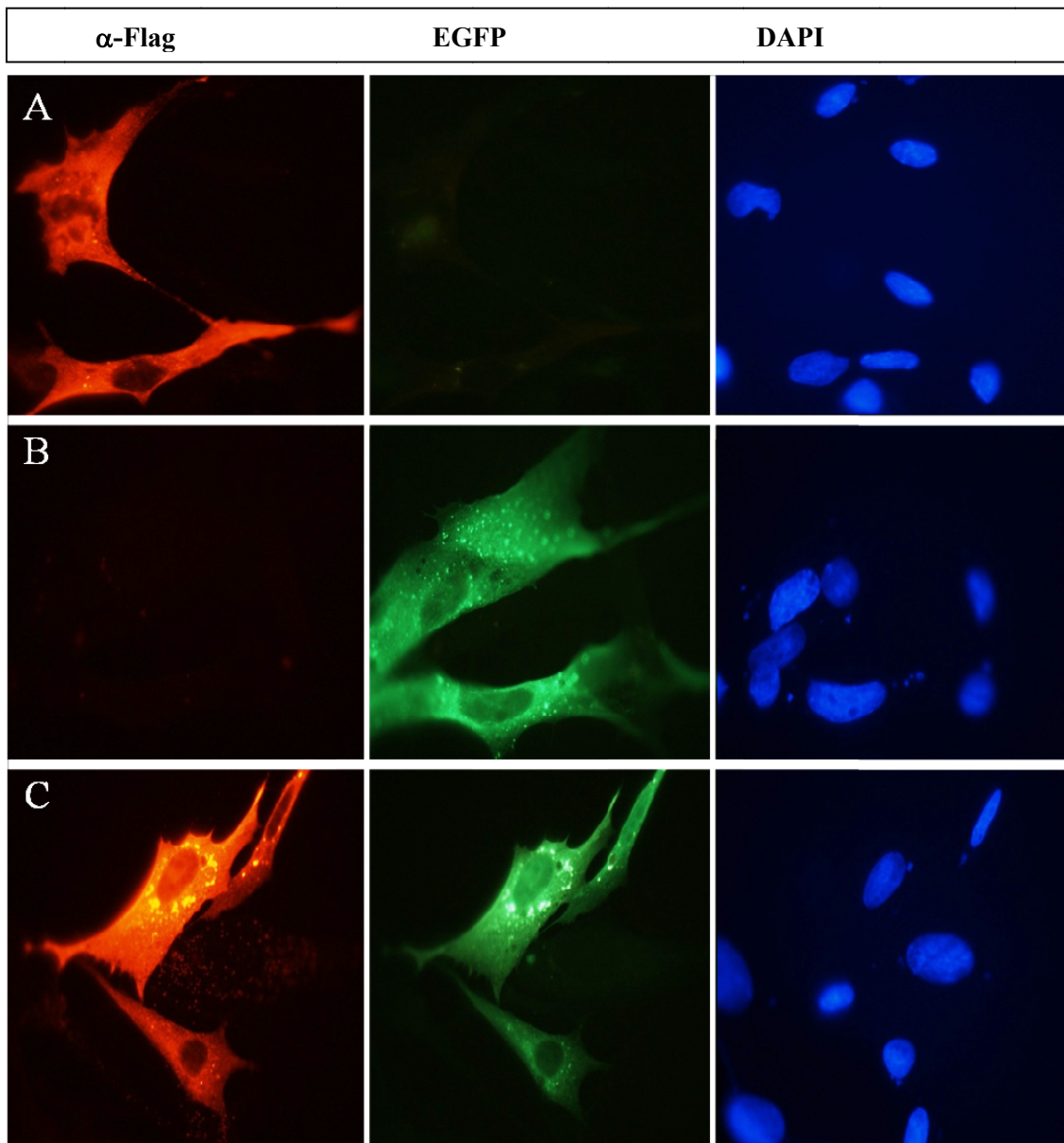


Figura 34. Imágenes de microscopía de fluorescencia de 3A^{wt}. Células BHK-21 transfectadas con los plásmidos indicados, fijadas a las 24 hpt y reveladas con anti-Flag y Alexa Fluor (izquierda) o emisión directa de EGFP (centro) y núcleos teñidos con DAPI (derecha). **(A)** p3AF, **(B)** pEGFP[3A], **(C)** pEGFP[3AF]. Aumento: 10000x.

Cuando se realizó el mismo experimento con las mutantes de 3A $\Delta 6-11$, $\Delta 6-17F$ y $\Delta 6-23$ unidas a *Flag*, se observó también que estaba presente en el citoplasma, aunque los gránulos no fueron notables (Figura 35).

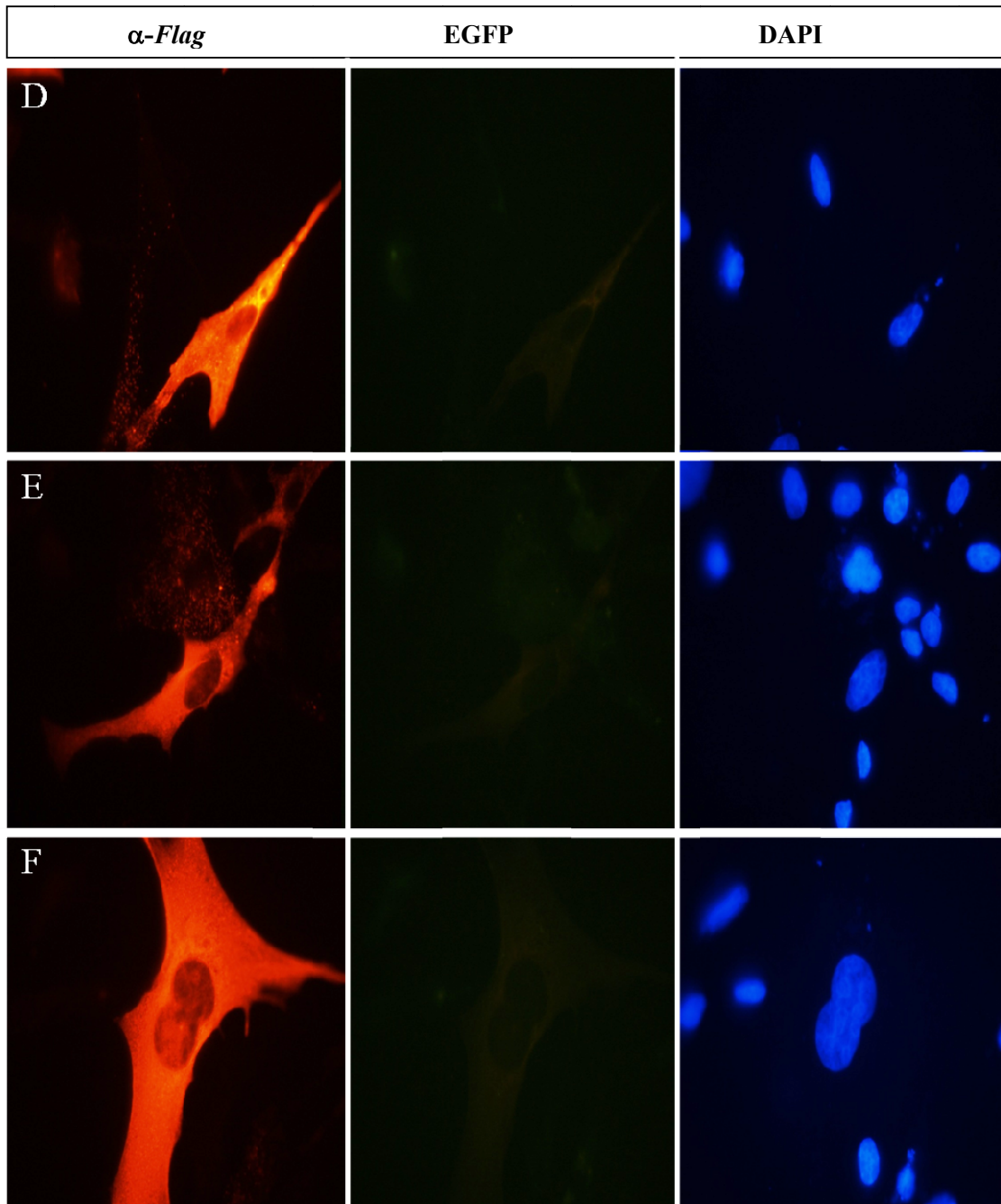


Figura 35. Imágenes de microscopía de fluorescencia de mutantes de 3A. Células BHK-21 transfectadas con los plásmidos indicados, fijadas a las 24 hpt y reveladas con anti-Flag y Alexa Fluor (izquierda) o emisión directa de EGFP (centro) o tinción con DAPI (derecha). **(D)** pΔ6-11F; **(E)** pΔ6-17F; **(F)** pΔ6-23F. Aumento 10000x.

4.3.2. Evaluación de cambios en la asociación a membranas internas de la mutante de 3A deletada en la región transmembrana.

Para evaluar si la delección de la zona propuesta como transmembrana de la proteína 3A afecta la ubicación de la misma, se construyó un plásmido con la mutante

correspondiente para su expresión individual bajo el promotor CMV, denominado p Δ TMF.

Se transfectaron células BHK-21 con los plásmidos p3AF o p Δ TMF, con 0,5 μ g de DNA, y se fijaron las células para la técnica de IFI a las 16hpt (Figura 36).

Se observó una diferencia significativa en el patrón de ubicación de la proteína mutante Δ TM con respecto a la proteína 3A *wt*. La proteína delecionada en TM migró a la zona nuclear. Estos experimentos se analizarán más adelante con microscopía confocal, utilizando anticuerpos de referencia que identifican retículo, Golgi y microtúbulos.

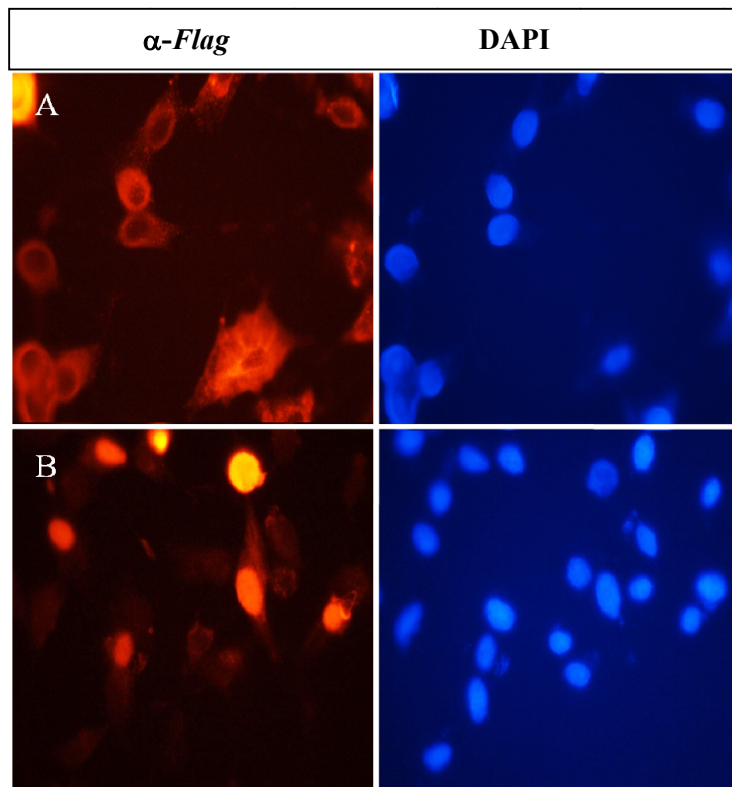


Figura 36. Análisis de células transfectadas con 3A *wt* y la mutante 3A Δ TM. Imágenes de microscopía de fluorescencia. Células BHK-21 transfectadas con los plásmidos indicados y fijadas a las 16 hpt. Se observa la ubicación de la proteína 3A expresadas por los plásmidos (A) p3AF y (B) p3A Δ TMF, detectadas con anticuerpo anti-Flag. Núcleos teñidos con DAPI. Aumento 10000x.

4.3.3. La mutante Δ TM en el contexto del sistema Replicón.

Se transfectaron células BHK-21, con 1 μ g de ADN de los plásmidos pRep o pRep Δ TM, y se fijaron para proseguir con la técnica de IFI a las 24 hpt. Identificando a las proteínas 3A con el Ac. monoclonal 3H7 con Alexa Fluor® 546 (rojo), ya que no poseen la etiqueta *Flag* en contexto del replicón. En este experimento se aumentó el

tiempo y la concentración de los plásmidos, dado que en una transfección previa con 0,5µg de ADN visualizada a las 16 hpt se observó poca expresión (Figura 37).

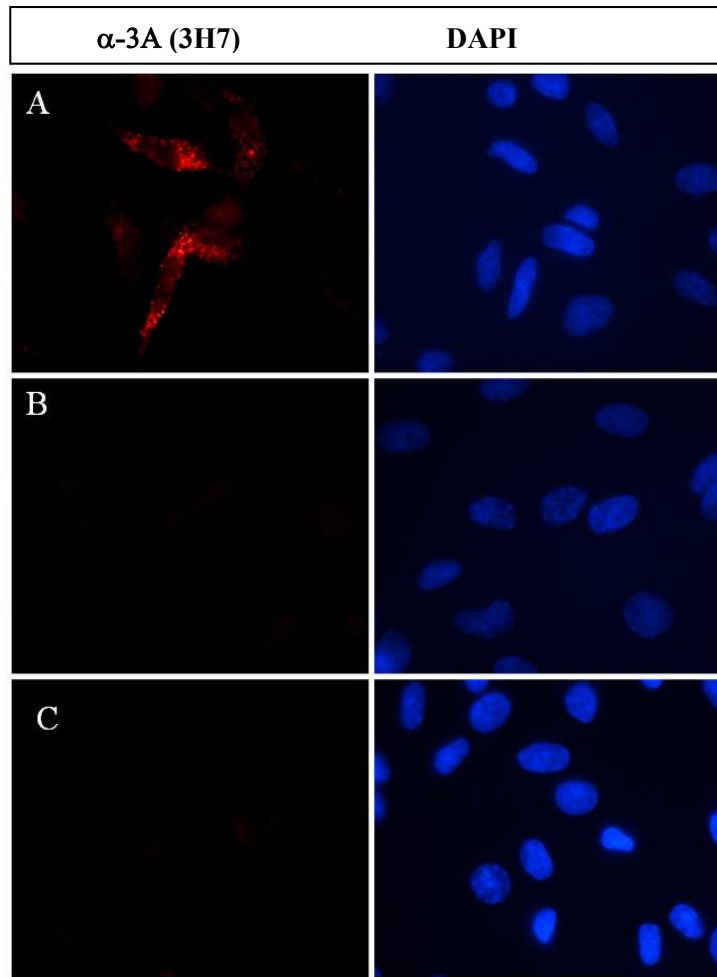


Figura 37. Análisis de células transfectadas con pRep y la mutante pRep Δ TM. Imágenes de microscopía de fluorescencia. Células BHK-21 transfectadas con los plásmidos indicados y fijadas a las 16 hpt. **(A)** pRep y **(B)** pRep Δ TM; **(C)** Control de células. Paneles izquierda: detección con anticuerpo 3H7 y Alexa Fluor; paneles derecha: tinción con DAPI. Aumento 10000x.

Se puede observar que solo se detecta la proteína 3A *wt* en el replicón pRep, siendo la expresión baja (panel A). En el caso de pRep Δ TM, no hay expresión de 3A, o es tan baja, que no se diferencia del control de células sin transfectar (paneles B y C, respectivamente).

En este sentido, se destaca que el método de detección por medición de Luciferasa es mucho más sensible y permite detectar las diferencias de expresión.

4.3.4. Evaluación de cambios en la asociación a membranas internas de las mutantes 3A Δ 6-23 y 3A Δ TM mediante microscopía confocal.

Para poder evaluar más específicamente la ubicación celular, se realizó una inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos de conejo de referencia que detectan Golgi (anti-giantina) y Microtúbulos (anti-tubulina), donados gentilmente, por el Dr. Gabriel Iglesias del Instituto Leloir, y revelados con Alexa Fluor® 488 (verde). Las proteínas 3A, fueron identificadas con anti-Flag o con el Ac. monoclonal 3H7 con Alexa Fluor® 546 (rojo), en el caso del replicón, que no posee la etiqueta Flag (Ver Anexo III).

Las fijaciones se realizaron a las 16 hpt, para los plásmidos que expresan las proteínas de forma individual bajo el promotor CMV (3AF, 3A Δ TMF y 3A Δ 6-23F), mientras que para los plásmidos en el contexto del replicón, se fijaron a las 24 hpt, a fin de contar con mayor cantidad de proteína (pRep y pRep Δ TM). En ambos casos se incluyó un control de células sin transfectar.

Los núcleos se tiñeron con TO-PRO®-3 iodide (Thermo Fisher Scientific), cedido amablemente por la Dra. Flavia Zanetti. Los preparados fueron observados en el Microscopio Confocal Olympus FluoView™1000 (Instituto de Medicina Experimental-IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina).

Se observa que la proteína 3A *wt*, como fue descripto anteriormente, se localiza en pequeñas vesículas citoplasmáticas, con apariencia de gránulos (O'Donnell y cols., 2001, Garcia-Briones y cols., 2006), mientras que la mutante 3A Δ 6-23F no los forma y colocaliza parcialmente con el complejo de Golgi. También se observó una diferencia en el patrón de ubicación de la proteína mutante 3A Δ TMF la cual migra a la zona nuclear y tampoco forma gránulos (Figuras 38 y 39).

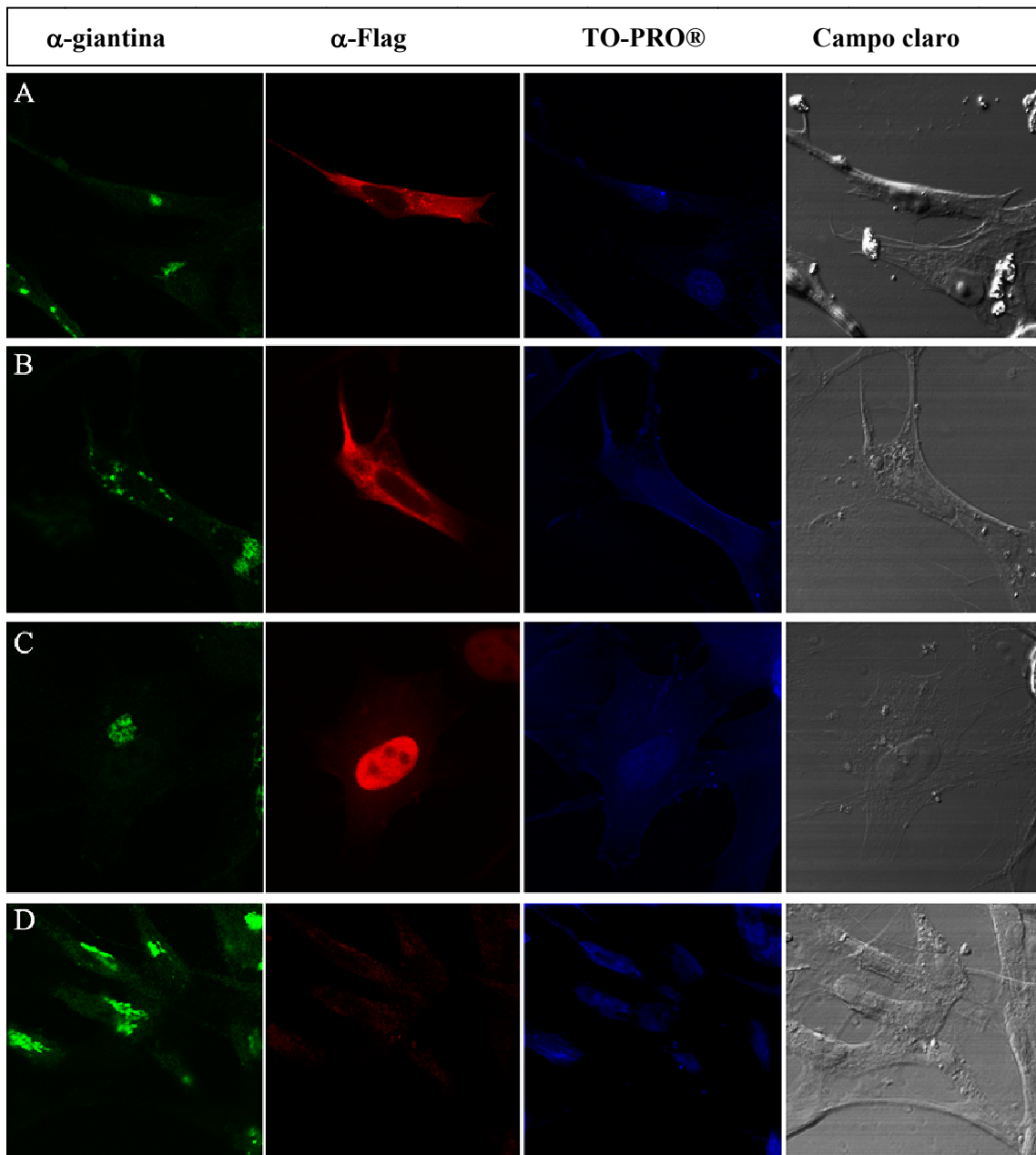


Figura 38. Localización de la proteína 3A, sus mutantes y el complejo de Golgi. Evaluación de la localización por medio, de la expresión transitoria de la proteína 3A y sus mutantes: (A) 3A, (B) 3A Δ 6-23, (C) 3A Δ TM, (D) Control de células; utilizando el anticuerpo anti-Flag y localización del complejo de Golgi, mediante anti-giantina, según se indica. Los núcleos fueron teñidos con TO-PRO®. Microscopio Confocal Olympus FluoView™1000 (Instituto de Medicina Experimental). Aumento: 10000x.

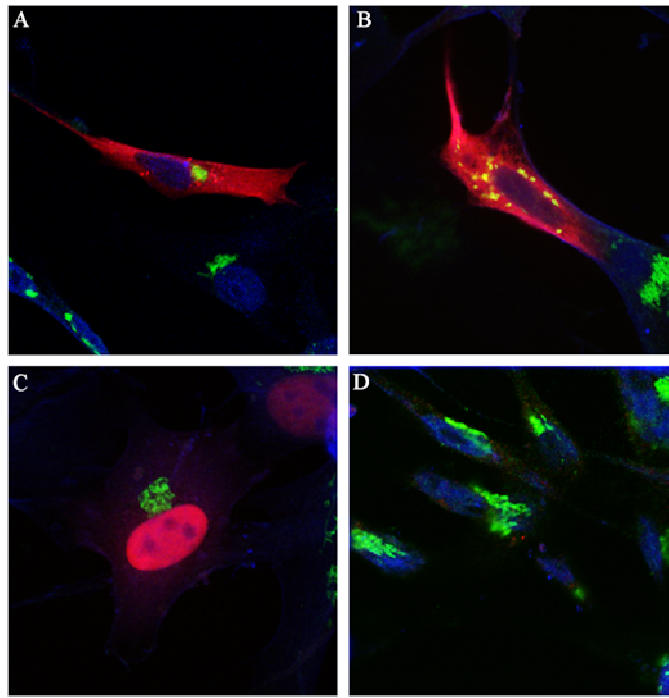


Figura 39. Superposición de la localización de la proteína 3A, sus mutantes y el complejo de Golgi. Evaluación de la localización por medio de la expresión transitoria de la proteína 3A y sus mutantes. Superposición (*merge*) de imágenes, utilizando el anticuerpo anti-Flag (rojo) y localización del complejo de Golgi, mediante anti-giantina (verde). (A) 3Awt, (B) 3AΔ6-23, (C) 3AΔTM, (D) Control de células. Los núcleos fueron teñidos con TO-PRO® (Azul). Microscopio Confocal Olympus FluoView™1000 (Instituto de Medicina Experimental). Aumento: 10000x

En cuanto a la localización con tubulina, por un lado, los microtúbulos se observaron un poco desarmados por el proceso de fijación y permeabilización utilizado. Por otro lado, se puede ver que en el control de células hubo cierta reacción cruzada de Alexa Fluor® (rojo) con anti-tubulina (verde). Lo que se observa con claridad, son los gránulos formados por la proteína 3A, que no colocalizan con tubulina, mientras que en la transfección con proteína mutante 3AΔ6-23 éstos no se observan, sino que se la proteína se aprecia más dispersa en el citoplasma. Nuevamente se visualiza el cambio de ubicación de la proteína 3AΔTM, la cual migra al núcleo celular, sin formación de gránulos (Figura 40 y 41).

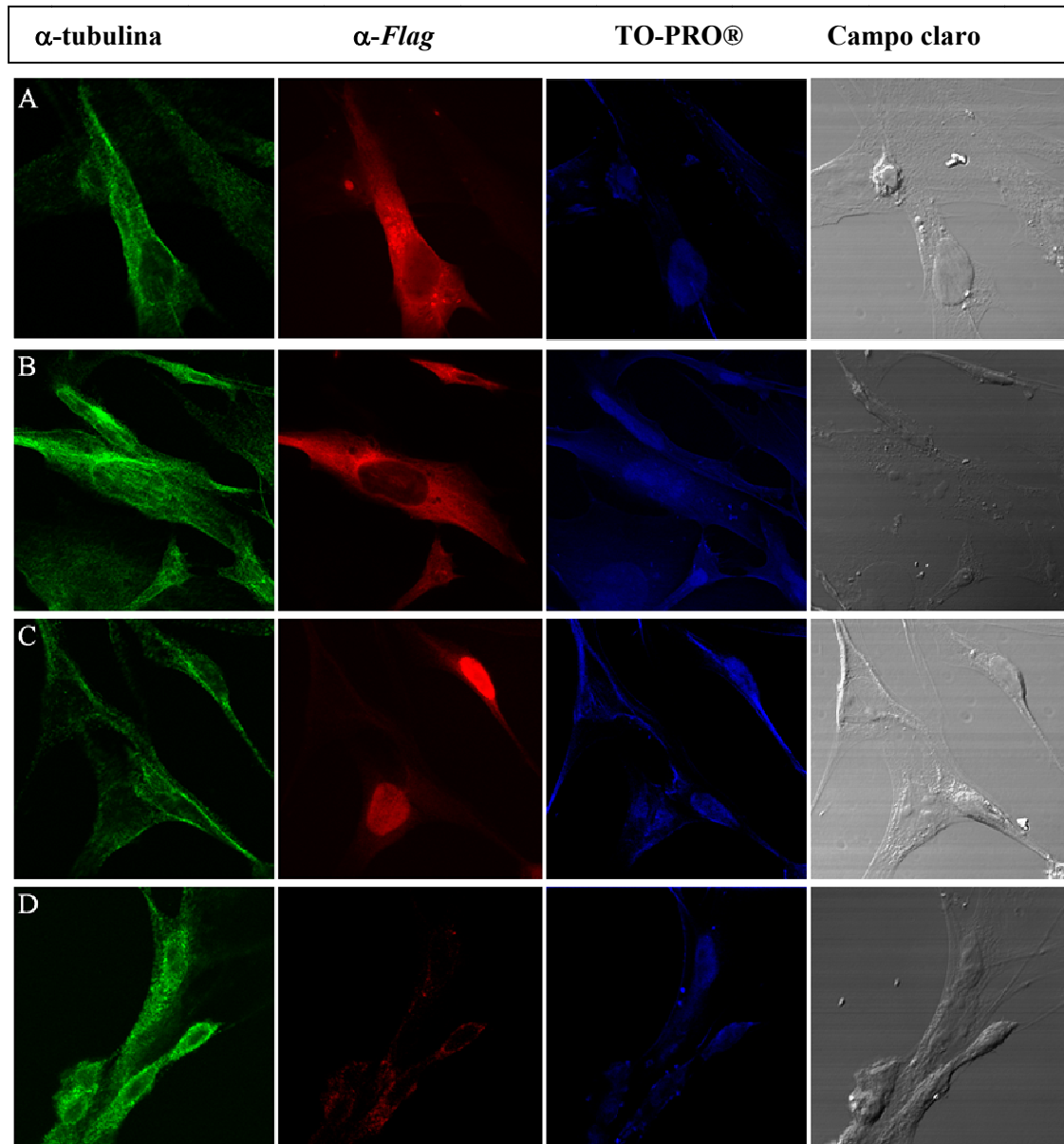


Figura 40. Localización de la proteína 3A, sus mutantes y tubulina. Evaluación de la localización por medio de la expresión transitoria de la proteína 3A y sus mutantes: **(A)** 3Awt, **(B)** 3A Δ 6-23, **(C)** 3A Δ TM, **(D)** Control de células; utilizando los anticuerpos anti-Flag y anti-tubulina según se indica. Los núcleos fueron teñidos con TO-PRO®). Microscopio Confocal Olympus FluoView™1000 (Instituto de Medicina Experimental). Aumento: 10000x

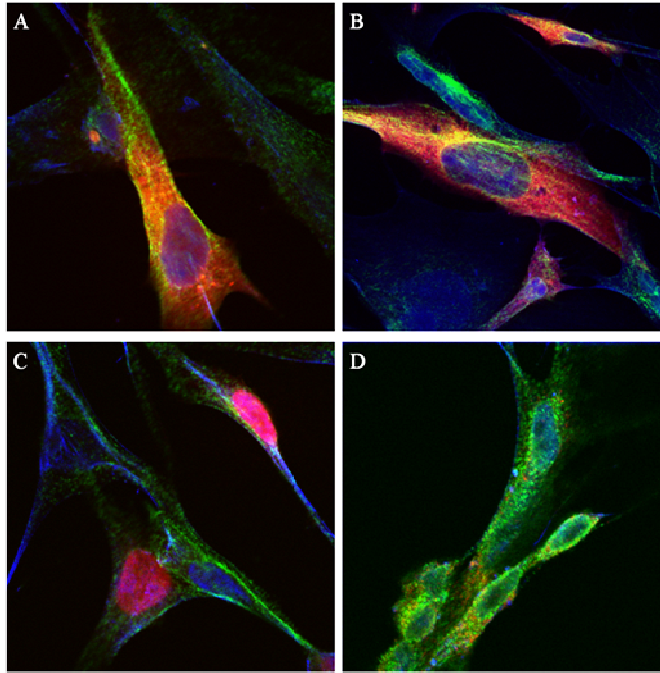


Figura 41. Superposición de la localización de la proteína 3A, sus mutantes y tubulina. Evaluación de la localización por medio, de la expresión transitoria de la proteína 3A y sus mutantes: **(A)** 3A wt, **(B)** 3A Δ 6-23, **(C)** 3A Δ TM, **(D)** control de células; Superposición (*merge*) de imágenes utilizando el anticuerpo anti-Flag (rojo) y localización de tubulina, mediante anti-tubulina (verde). Los núcleos fueron teñidos con TO-PRO® (azul). Microscopio Confocal Olympus FluoView™1000 (Instituto de Medicina Experimental). Aumento: 10000x

Se realizó la observación en el contexto Replicón. Cabe aclarar, que la mutante 3A Δ 6-23, no fue utilizada, ya que el epítipo del anticuerpo 3H7 disponible, que marca 3A, está deletado en esta mutante (ver más adelante).

En el contexto del replicón se observó, que hay una diferencia en la expresión de pRep y pRep Δ TM, que anteriormente no se detectó por IFI, probablemente por la mayor definición de este Microscopio.

En el pRep con 3Awt, se observan claramente las formaciones de gránulos alrededor del núcleo (Figura 42 (A)), como ocurre en infecciones virales. Obviamente, la cantidad de proteína es mucho menor, por lo que apenas se aprecia en la mutante que prácticamente no replica (Figura 42 (B)). En este caso, no migra al núcleo, por lo que se especula que podría estar formando complejos con otras proteínas virales.

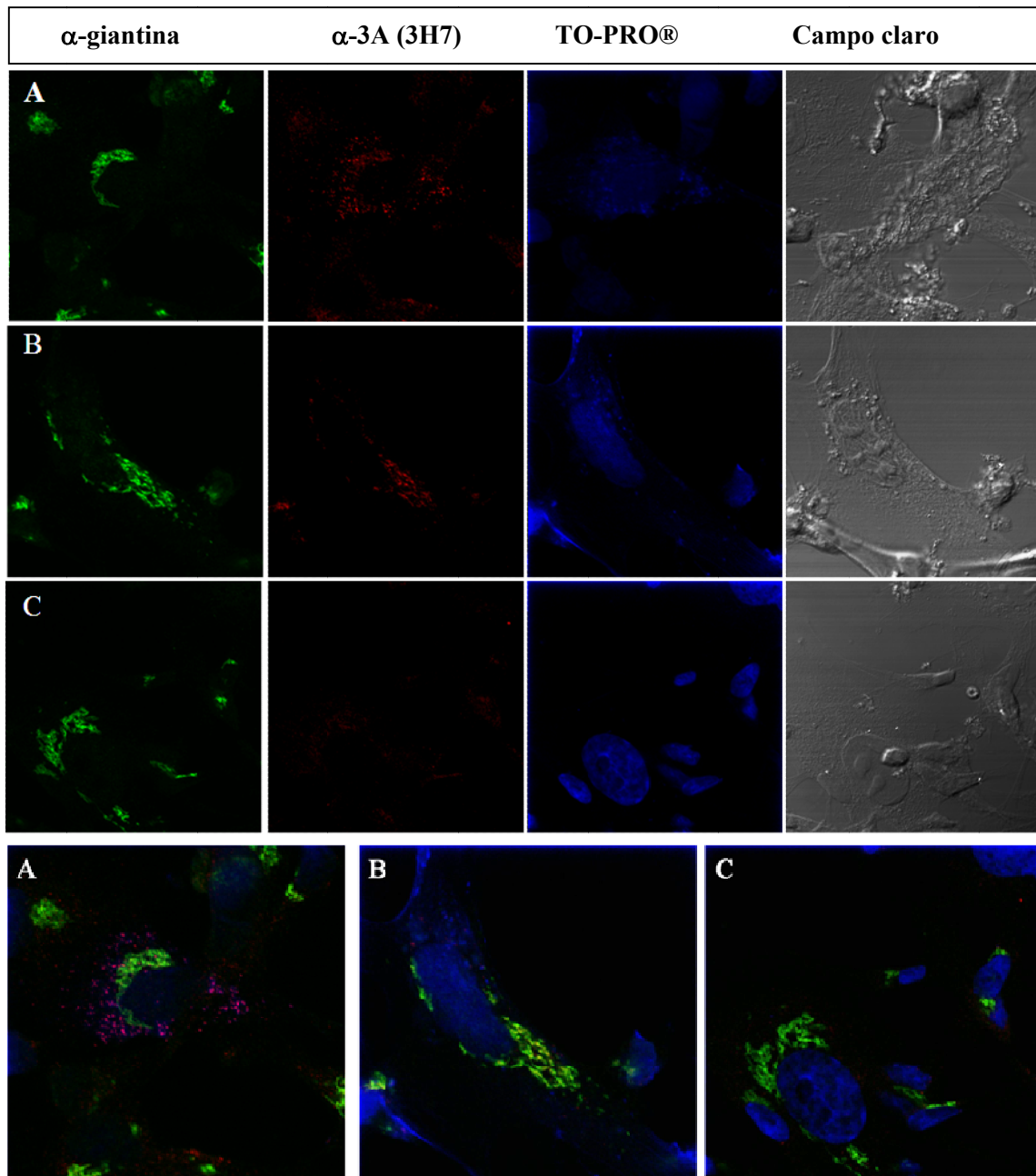


Figura 42. Localización de la proteína 3A_wt, 3A Δ TM y el Complejo de Golgi en el contexto del replicón. Evaluación de la localización por medio, de la expresión transitoria de la proteína 3A y sus mutantes: (A) pRep3A_wt, (B) pRep3A Δ TM, (C) control de células. Se utilizó el anticuerpo 3H7 y localización del complejo de Golgi, mediante anti-giantin, según se indica. Los núcleos fueron teñidos con TO-PRO® Panel inferior: Superposición (*merge*) de imágenes. Microscopio Confocal Olympus FluoView™1000 (Instituto de Medicina Experimental). Aumento: 10000x

En la Figura 43 (A) el pRep con 3A_wt, nuevamente se observan las formaciones de gránulos alrededor del núcleo, mientras que en la mutante 3A Δ TM no se puede diferenciar del control (Figura 43 (B) y(C), respectivamente). En este experimento, el anticuerpo anti-tubulina, presenta reacción cruzada con el Alexa Fluor® (rojo), como mencionamos anteriormente, por lo cual, si había baja cantidad de 3A Δ TM, la misma no sería diferenciada.

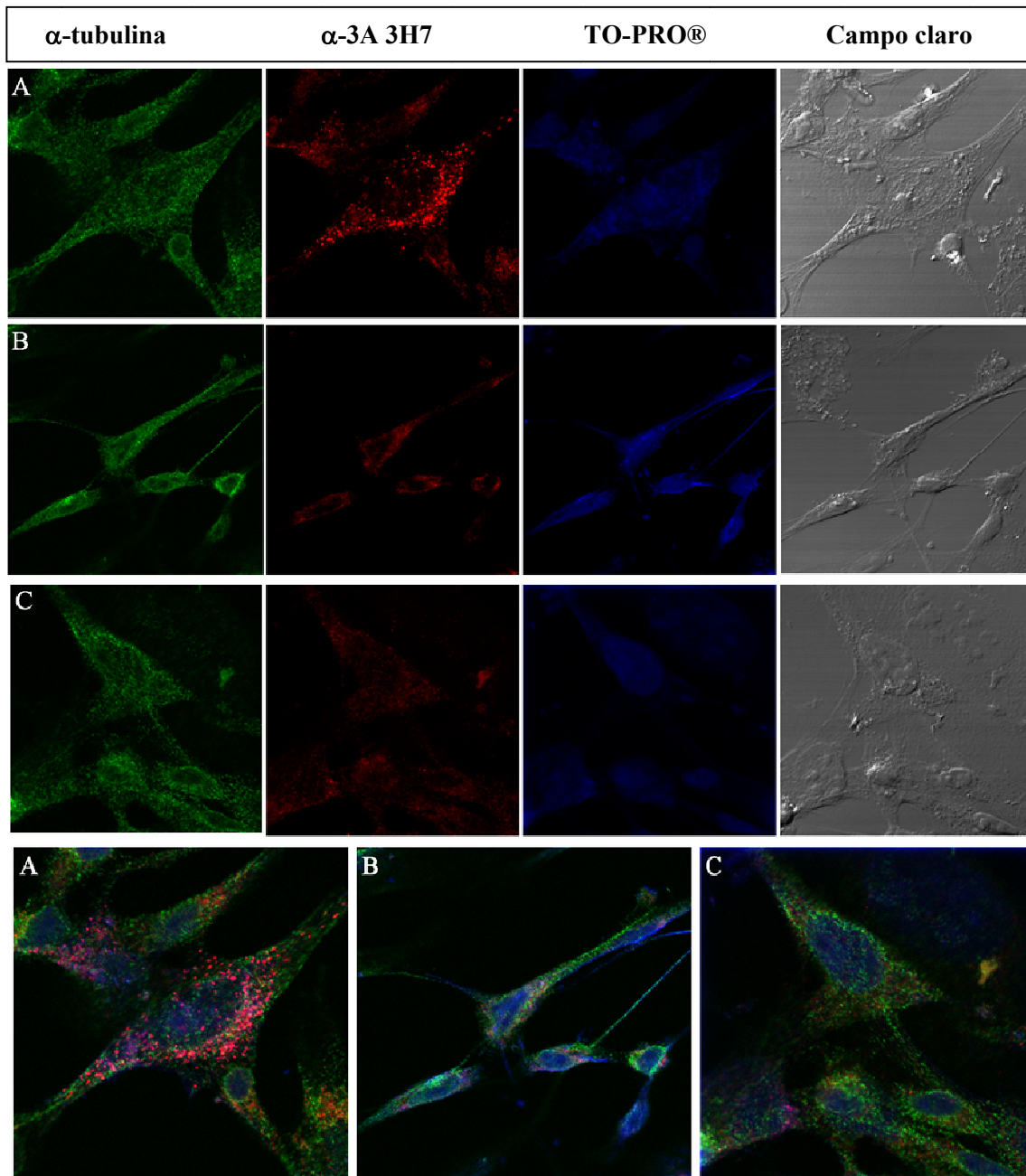


Figura 43. Localización de la proteína 3A_{wt}, 3A Δ TM y tubulina en el contexto del Replicón. Evaluación de la localización por medio, de la expresión transitoria de la proteína 3A y sus mutantes: (A) pRep3A_{wt}, (B) pRep3A Δ TM, (C) control de células. Se utilizó el anticuerpo 3H7 y anti-tubulina, según se indica. Los núcleos fueron teñidos con TO-PRO®). Panel inferior: Superposición (*merge*) de imágenes. Microscopio Confocal Olympus FluoView™1000 (Instituto de Medicina Experimental). Aumento: 10000x.

4.4. Inclusión de las mutantes de 3A en un clon infeccioso del VFA

El objetivo fue evaluar las mutantes en el contexto de un clon completo infeccioso del VFA. Para ello se partió de un clon de genoma completo existente en el laboratorio (Tesis doctoral, Giraldez 2013), para subclonar en pRep las proteínas de la cápside reemplazando al gen Luc.

Se diseñó el clonado de las proteínas de la cápside de la cepa O1/Campos al pRep utilizando sitios de restricción únicos en el genoma viral. En este caso, por conveniencia del sitio de corte, se subclonó un *cassette* conteniendo Lpro y el 5'UTR, junto con las proteínas capsidales.

Se transfectaron tres de estos clones en células BHK-21, y se realizaron 5 pasajes seriados, sin obtener evidencia de efecto citopático.

Posteriormente, se intercambiaron segmentos de ADNc de distintas regiones de forma de incorporar la región P1 en forma viable para la formación de partículas, por ejemplo, se intentó con una ER, con corte, sobre la proteína Lpro. Nuevamente, se clonó y se probaron dos clones del tamaño esperado, positivos por restricción enzimática.

Se cotransfectaron células BHK-21, en placas de 24 pocillos mediante Lipofectamina, con los nuevos plásmidos (pClon) utilizando 2 µg de ADN purificado y 0,01 µg pCA-T7, y a las 48hs se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 44.

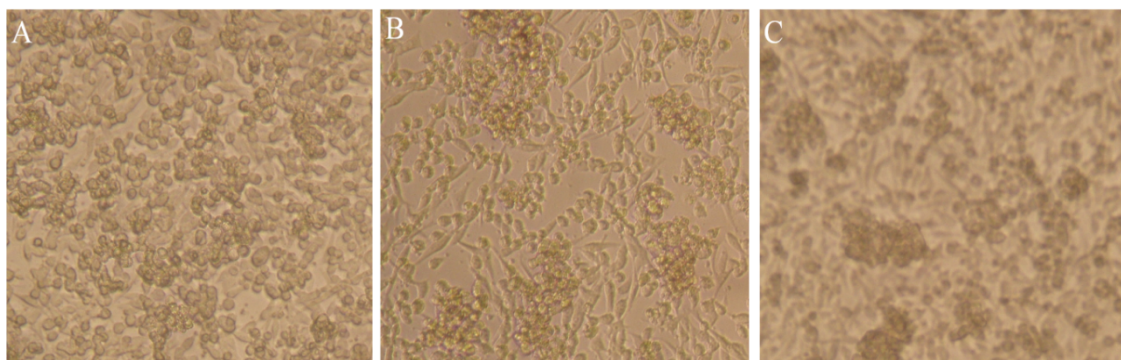


Figura 44. Transfección con el clon de genoma completo en células BHK-21. Co-transfección en células BHK-21, en placas de 24 pocillos, de los plásmidos pClon (2µg), junto con pCA-T7 (0,1µg). Fotografiadas 48 hpt. (A) Mock, (B) Clon1, (C) Clon2.

El aparente efecto citopático observado a las 48 horas (Figura 44 (B) y (C)) no se repitió en los pasajes siguientes. Eventualmente podrían haberse formado partículas, que no fueron capaces de infectar células nuevas.

A pesar de los intentos realizados, este trabajo no se pudo completar en el marco de tiempo de esta tesis. Una reflexión, es que de todos modos, como las mutantes de la proteína 3A disminuyen mucho la replicación, es probable que no se obtuvieran partículas virales de estos genomas.

Capítulo II:

Utilización de la proteína 3A para la detección de anticuerpos marcadores de infección viral en bovinos

4.5. Diseño de un ELISA de diferenciación de animales vacunados de infectados basado en la proteína de fusión 3A-GFP (3AGFP-ELISA).

Como se describe en la Introducción de esta tesis, el precursor 3ABC y el anticuerpo monoclonal 3H7 son utilizados desde hace muchos años en Argentina y otros países para detección de la circulación viral en la población animal y para el control de la pureza de las vacunas contra la fiebre aftosa.

La Tabla 1 describe los sueros de referencia utilizados y la codificación adoptada para facilitar la exposición de los resultados.

Tabla 1. Sueros de Referencia.

Sueros de referencia	Codificación
Positivos	
C3-4	Pa
P+	Pb
C+****	Pc
C6-7	Pd
5+	Pe
conv5	Pf
Positivos débiles	
Q2*	Da
Q8*	Db
191	Dc
491	Dd
Negativos	
C-**	Na
suero de campo***	Nb

*Cercanos al límite de detección de ELISA 3ABC

** Pool de animales de áreas libres sin vacunación

*** Sueros de animales vacunados analizados individualmente (Nb₁ a Nb₃₆₃)

**** Suero de bovino inoculado con 3ABC

Basado en los conocimientos y herramientas que poseía el laboratorio junto con otros incorporados en este trabajo, se diseñó un ensayo que pudiera complementar o facilitar al existente, utilizando una proteína de fusión entre 3A y GFP y se exploró su capacidad como sonda serológica en un ELISA indirecto para diferenciar sueros de bovinos vacunados, infectados y no infectados.

Las construcciones diseñadas se representan en la Figura 22 (M&M). La proteína de fusión fue expresada en bacterias BL21(DE3). También se expresó, como control negativo, el plásmido pGEX-2T[GFP] que expresa solo GFP (Tesis doctoral, Romanutti, 2012).

Se caracterizó el antígeno por Western Blot (Figura 45) confirmando la expresión de una proteína de fusión (3A-GFP) con el peso molecular esperado (44 a 45 Kd) y reacciona con el Ac. monoclonal 3H7 y el suero policlonal anti-GFP de conejo. La proteína 3A-GFP reaccionó fuertemente con suero de bovino infectado (calle 2, suero Pa) pero no se detectó reactividad con suero de un animal vacunado no infectado (calle 2, suero Nb₁).

La excelente relación de señal a fondo que se muestra en el perfil de transferencia de Western blot sugirió que 3A-GFP podría ser un candidato adecuado como sonda en un inmunoensayo para diferenciar los sueros de animales infectados y no infectados, independientemente del estado de vacunación.

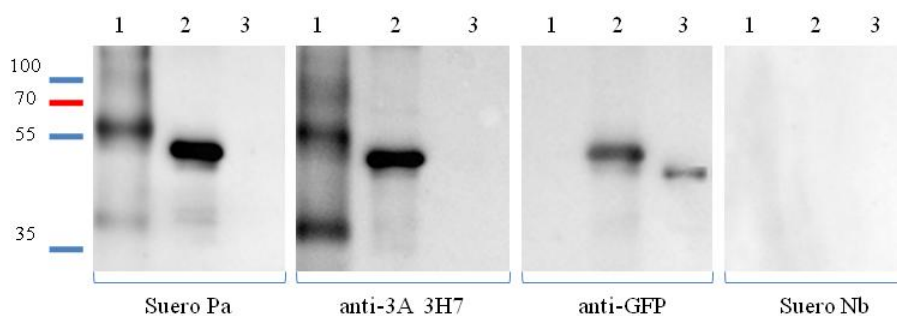


Figura 45. Caracterización del antígeno 3AGFP en ensayos de Western blot. Cuerpos de inclusión parcialmente purificados de 3ABC (calle 1), 3A-GFP (calle 2) y GST-GFP (calle 3) separados en 12% SDS-PAGE, transferido a nitrocelulosa y testeados contra el suero de referencia convaleciente (Suero Pa) y suero de animal vacunado (suero Nb₁). Se incluyeron controles con suero policlonal anti-GFP y monoclonal anti-3A 3H7. Las barras a la derecha representan pesos

Para poner a punto el 3AGFP-ELISA, se prepararon diluciones de sueros positivos conocidos (1/50, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000), que ya habían sido evaluados anteriormente por la técnica 3ABC-ELISA y EITB. La concentración de suero anti-bovino conjugado utilizada fue la recomendada por el laboratorio productor (ver Anexo III). El esquema utilizado para este ELISA, está representado en la Figura 46.

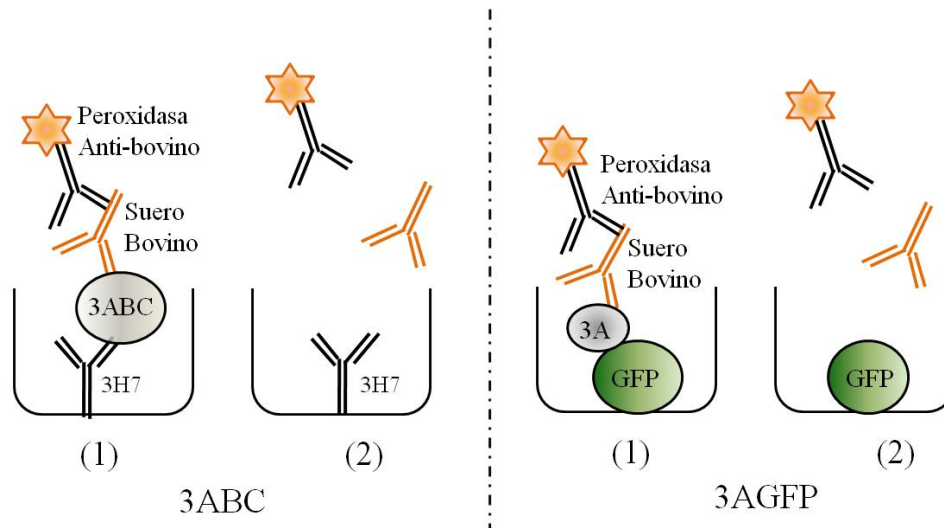


Figura 46. Esquemas comparativos de 3ABC-ELISA y 3AGFP-ELISA. El protocolo 3ABC-ELISA requiere el recubrimiento del pocillo con el ac. Monoclonal 3H7 seguido de incubación con un lisado bacteriano de 3ABC recombinante (pocillo de ensayo, 1) o solución salina tampón de bloqueo (control, 2). En el 3AGFP-ELISA, el pocillo de ensayo (1) se recubre con proteína recombinante 3A-GFP y el pocillo control (2) con GFP recombinante. Se añade el suero a ensayar a los pocillos 1 y 2 en ambas pruebas ELISA, seguido de un Ac. conjugado con peroxidasa y el desarrollo cromogénico.

Se utilizó 3A-GFP, en el pocillo de prueba, y GFP-GST, en el pocillo control negativo, en paralelo para cada muestra (ver 3.10, M&M). La DO neta está dada por la diferencia entre la DO absoluta de 3A-GFP y la DO absoluta de GFP-GST.

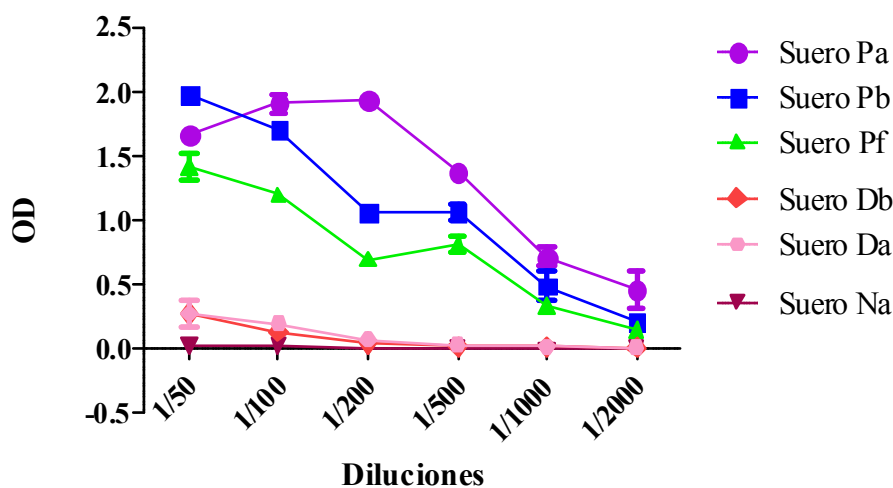


Figura 47. Diluciones de sueros de referencia, evaluadas en el 3AGFP-ELISA. Sueros bovinos anti-aftosa, controles positivos: Suero Pa, Pb, Pf, Da y Db; y el control negativo Suero Na. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

La Figura 47 muestra los resultados de la titulación de los sueros positivos y negativos de referencia. Cada dilución se evaluó por duplicado.

Basados en estos datos, el 3AGFP-ELISA se realizó con una dilución 1/100 de los sueros, ya que todavía se detectan los sueros positivos débiles (Sueros Da y Db) y a la vez disminuye el *background* que generan los sueros bovinos.

En un análisis inicial de los sueros positivos en nuestro 3AGFP-ELISA, podemos diferenciar en sueros positivos fuertes (Suero Pa, Pb, Pc y Pd), intermedios (Pe y Pf) y débiles (Da, Db, Dc y Dd).

Se realizaron 6 determinaciones para cada suero, en 3 placas por duplicados. Se graficó la DO neta media y el DS para cada grupo. Se puede observar una gran capacidad del ensayo para discriminar entre sueros positivos. (Figura 48).

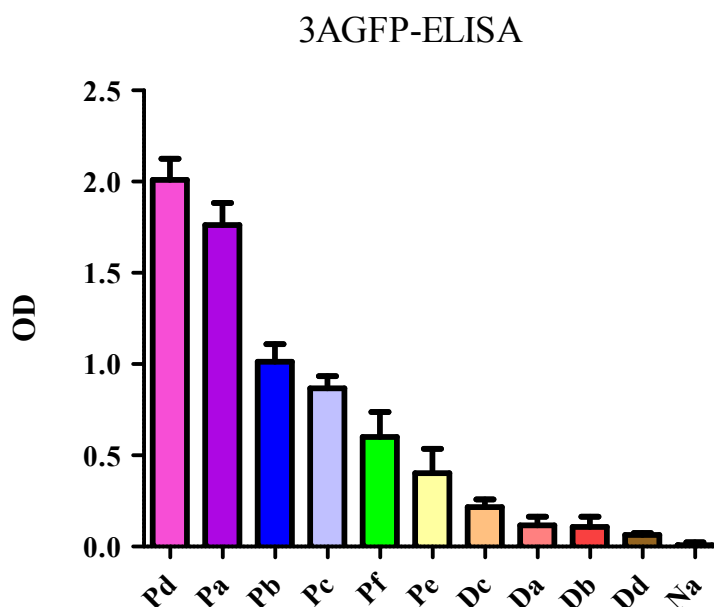


Figura 48. Análisis de sueros positivos en el 3AGFP-ELISA. Sueros bovinos anti-aftosa, positivos (Pa, Pb, Pc, Pd, Pe y Pf) y positivos débiles (Da, Db, Dc y Dd) y el suero negativo Na (pool de sueros negativos para aftosa). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado, en 3 placas independientes.

4.6. Análisis de sueros por 3AGFP-ELISA y 3ABC-ELISA

Se analizaron 363 sueros bovinos con ambos ELISAs, 3ABC y 3AGFP. De estos sueros, 8 pertenecían a bovinos no vacunados ni infectados (*naïve*), y 355 a animales de campo vacunados no infectados (Sueros Nb₁₋₃₆₃). A estos sueros incógnita se le sumaron 5 sueros controles positivos de referencia (Sueros Pa, Pb, Pc, Da y Db) y un pool de sueros *naïve* como control negativo (Suero Na) (Ver Tabla 1). Los sueros positivos según el diagnóstico por 3ABC y confirmación posterior por EITB se dividen en, positivos (Pa, Pb y Pc) y positivos débiles (Da y Db). Estos últimos se encuentran en el

límite de detección del ELISA-3ABC, y son los que marcaron el "nivel de corte" establecido en la prueba diagnóstica.

Los sueros Pa y Pb son derivados de animales convalecientes de Fiebre Aftosa. El suero Pc proviene de un animal experimentalmente inoculado con la poliproteína 3ABC. Los sueros Da y Db fueron colectados de animales enfermos en periodos tardíos de infección. El sueros Na, resulta de un pool de animales *naïve* de una región libre de aftosa sin vacunación. Los sueros agrupados en Nb provienen de animales evaluados individualmente (363 animales, Nb₁ a Nb₃₆₃).

Todas las placas utilizadas para 3ABC fueron validadas con los controles provistos por el kit (Pa, Pb, Pc, Da, Db y Na), es decir que en cada placa utilizada se evalúan los mismos sueros controles, los que deben generar valores dentro de rangos previstos (ver 3.10.2, M&M). Los mismos sueros incógnita fueron evaluados por 3AGFP-ELISA junto a los mismos controles. Se utilizaron 10 placas para cada ensayo, cada una incluye los sueros controles y las muestras de sueros de campo a evaluar (sueros Nb). Los valores obtenidos en DO netas fueron graficados por grupos cada uno con su media y DS para cada ELISA (Figura 49).

En el caso de 3AGFP-ELISA la DO neta es igual a la DO absoluta del pocillo que contiene 3AGFP menos la DO absoluta del pocillo que contiene GFP-GST.

En el caso de 3ABC-ELISA la DO neta es igual a la DO absoluta del pocillo que contiene 3ABC menos la DO absoluta del pocillo sin proteína.

Como se puede observar, el 3AGFP-ELISA, es muy bueno para discriminar diferentes sueros positivos entre sí, con poca dispersión entre los sueros positivos (Figura 49 A). Los resultados obtenidos en ambos ELISAs sobre los sueros positivos, nos lleva a proponer que es probable que esten detectando diferentes anticuerpos que componen las muestras de suero (Figura 49 A y B), esta es una de las multiples razones para la caracterización del anticuerpo 3H7 (ver más adelante). También pudimos observar en la Figura 49 tabla C por medio del DS de los grupos evaluados, que el 3AGFP presenta muy buena repetibilidad.

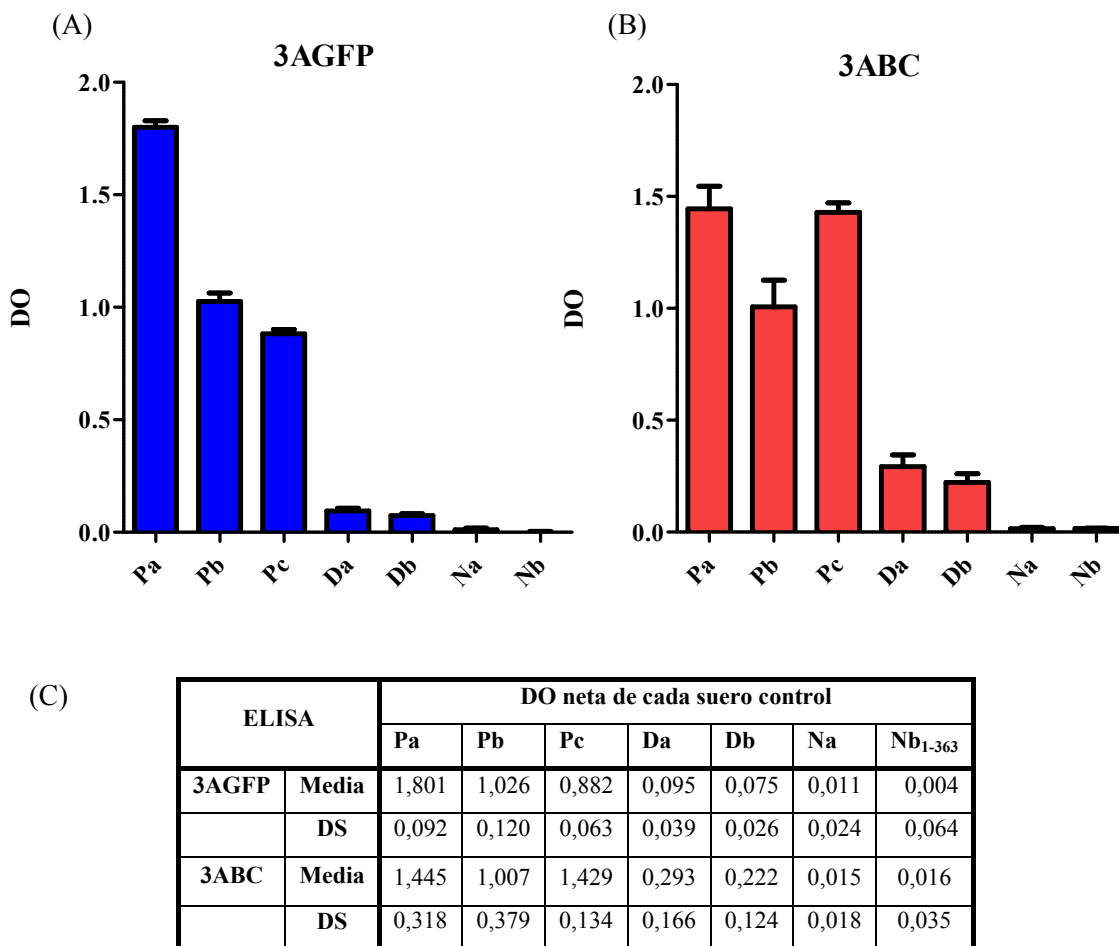


Figura 49. Gráfico de DO de 3AGFP-ELISA y 3ABC-ELISA. Se realizaron 10 determinaciones por grupo (Sueros Pa, PbB, Pc, Da, Db y Na). Los valores absorbancias del grupo de 363 muestras de sueros de campo evaluados individualmente se graficaron como Nb (A) 3AGFP-ELISA y (B) 3ABC-ELISA. (B) Tabla con las Medias y DS de los diferentes sueros controles analizados por ambos ELISAs.

4.6.1. Obtención del valor de corte mediante Actividad Relativa.

Una forma de diferenciar sueros positivos, negativos y dudosos, es utilizando la Actividad Relativa (AR), para la cual, se toma un valor como 1 o 100%, y se hace una relación de los demás valores a él en cada placa. Esto disminuye la variación entre distintas placas, causada por diferentes lotes de reactivos, el operario o la técnica en sí.

En el caso del 3ABC-ELISA, se utiliza el control Pc (que corresponde a un bovino inoculado con la proteína 3ABC) a cuya medida se le da el valor del 100%. Este suero se eligió con fines operativos, ya que no siempre se dispone de sueros de animales infectados, para la elaboración de los kits. El valor de corte utilizado es de entre 15-20% para los sueros dudosos y por encima del 20% se consideran positivos. Igualmente, tanto sueros dudosos como positivos, se deben analizar posteriormente por la técnica de EITB para confirmar el diagnóstico. La utilización de AR en este test disminuye

notablemente la variación en el mismo. Los sueros positivos débiles Da y Db, que fueron evaluados mediante 3ABC, al estar al límite del nivel de corte del test son detectados como sospechosos (15-20%).

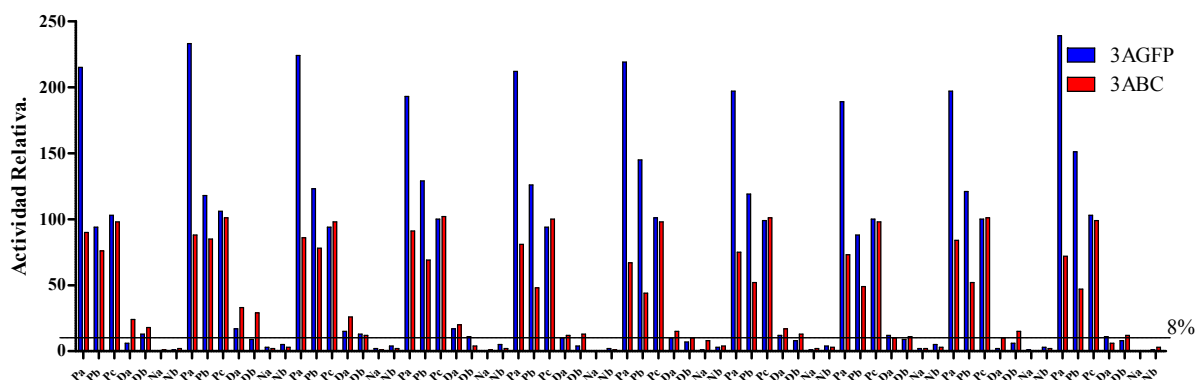
Para el 3AGFP-ELISA se utilizó como valor del 100% el mismo suero que para 3ABC (Pc), la conversión de los valores en AR mantienen la variación similar a los registros de OD, probablemente, porque no se variaron ni el operario ni el lote de reactivos utilizados (Figuras 49 y 50 (C)). Podemos observar, que comparando ambas pruebas, en especial para los valores de los positivos débiles Da y Db, el 3AGFP presenta menor variación (Figura 50 (C)). Observamos que igualmente se siguen discriminando de manera óptima los diferentes sueros positivos (Figura 50). Se podría sugerir tomar el valor de AR del 8%, como valor de corte para el 3AGFP-ELISA, el cual se encuentra por debajo de la media obtenida para el suero Db, caracterizado como el positivo débil de valor más bajo, el mismo que se tomó de referencia en la prueba de 3ABC-ELISA. A su vez, el valor de AR del 8% para 3AGFP se encuentra a 5 DS de los valores AR del suero negativo Na.

En el gráfico de barras, Figura 50 (A), podemos ver la AR de los sueros de referencia, de ambos ELISAs graficando cada valor individualmente. Se realizaron diez determinaciones independientes para cada test y en diferentes días.

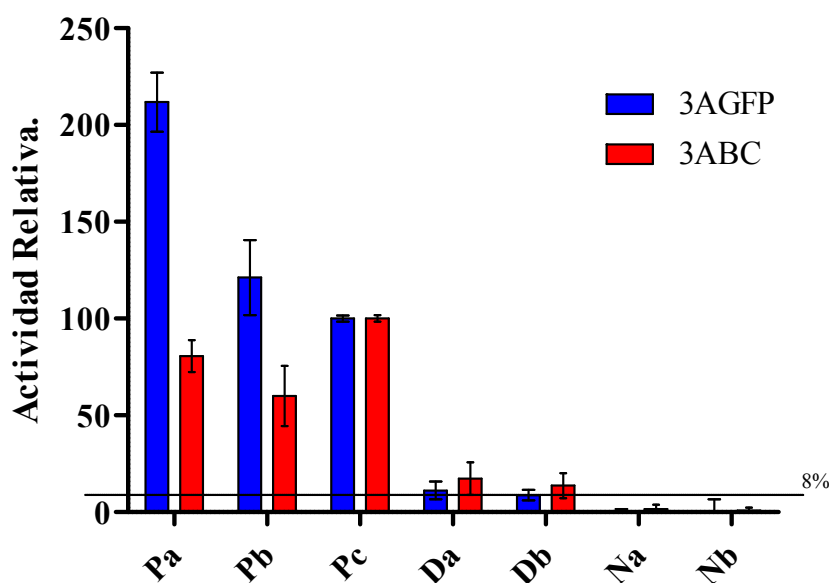
Los datos numéricos de las medias y DS de los valores en DO para cada miembro del panel de referencia se encuentran en la tabla de la Figura 49 (C). Mientras que los datos numéricos de las medias y DS de los valores en AR para cada suero de referencia se encuentra en la tabla de la Figura 50 (C).

Como se puede observar, los sueros positivos Pa y Pb, son claramente diferenciados de los sueros negativos Na y Nb₁₋₃₆₃ en ambos ELISAs, 3AGFP (211/121 vs 0/1,5 respectivamente) y 3ABC (80/60 vs 1,5/ 0,8 respectivamente). El ELISA basado en 3AGFP es por lo tanto capaz de identificar anticuerpos contra VFA en los sueros de referencia Pa, Pb y Pc, y aparece casi tan sensible como el 3ABC-ELISA para clasificar los sueros positivos débiles Da y Db y diferenciarlos de los sueros controles negativos.

(A)



(B)



(C)

ELISA		Actividades Relativas de cada suero control						
		Pa	Pb	Pc	Da	Db	Na	Nb ₁₋₃₆₃
3AGFP	Media	211,80	121,20	100,00	11,20	8,80	0,000	1,53
	DS	15,32	19,48	1,56	4,69	2,90	1,52	5,07
3ABC	Media	80,67	60,02	100,12	17,30	13,76	1,58	0,83
	DS	8,27	15,51	1,75	8,43	6,38	2,32	1,56

Figura 50. AR de los sueros de referencia evaluados en 3ABC-ELISA y 3AGFP-ELISA. (A) Representación en gráfico de barras de valores AR obtenidos en 10 determinaciones independientes de sueros positivos (Pa, Pb y Pc), positivos débiles (Da y Db) y dos sueros control negativos, un control de animales *naïve* (Na) y otro de animales vacunados libres de aftosa (Nb) con ambos ELISAs. Los valores en DO neta fueron llevados a AR tomando como 100 % el suero Pc. **(B)** Representación gráfica conteniendo las medias numéricas y DS en AR respectivamente para cada uno de los 7 miembros del panel. El umbral del 8% está representado por la línea horizontal en ambos gráficos **(A)** y **(B)**. **(C)** Tabla con las Medias y DS de los diferentes sueros controles

En la figura 51 se puede observar, que en el 3AGFP-ELISA, hay algunos puntos de los sueros incógnitas que son negativos para 3ABC-ELISA sobrepasan el 8% (estas muestras fueron evaluadas una sola vez). Una causa, podría ser, que este nuevo ELISA, es más específico para 3A, y este detectando ciertos epitopes inducidos por esta proteína que no fueron detectados con 3ABC-ELISA que utiliza captura con el anticuerpo 3H7. O también, podrían ser falsos positivos de la técnica. En ambos casos, podrán ser discriminados con un ensayo confirmatorio, como el EITB u otro.

Posteriormente, se consideró un segundo valor de corte utilizando los valores de AR obtenidos con 363 sueros de animales vacunados no infectados, para introducir una categoría de sueros dudosos. El grafico de barras de la Figura 51 muestra el perfil de los AR de los sueros obtenidos con los ELISAS 3AGFP y 3ABC en paralelo (barras azules y rojas, respectivamente). También se observan las barras de referencia representando las medias individuales de AR de las ocho determinaciones independientes con los sueros Da y Db para ambos ELISAS. A partir de estos valores experimentales, se decidió utilizar el 15% de AR como segundo valor de corte, el cual delimita la zona de los sueros dudosos.

De esta forma quedarían los sueros Da y Db como positivos débiles y se considerarían como sueros dudosos a valores AR entre 8-15%, mientras que valores a partir de 15% serían considerados positivos. Igualmente, como ocurre con el 3ABC-ELISA, dichas muestras deberían confirmarse con la prueba de EITB u otra equivalente.

Los resultados sugieren que las ARs de los 363 animales testeados se encuentran por debajo del 15% de AR cuando son testeados independientemente con cada uno de los ELISAs, 3AGFP o 3ABC. Los valores de las medias en AR del total de las muestras testeadas corresponde al 1,5 y 0,8% respectivamente, al menos 5 veces más bajos que los valores de los positivos débiles Da y Db, que consistentemente mostraron ARs en el rango de 8-20% (Figura 51). La mayoría de los 363 sueros testeados mostraron ARs por debajo del 5% (95%-99% para el 3AGFP y 3ABC ELISAs respectivamente).

La determinación de la especificidad y sensibilidad del 3AGFP-ELISA no fueron obtenidas, ya que se debería disponer de mayor cantidad de sueros positivos para probar el test. Esta caracterización, queda por ser evaluada cuando se realice la validación del mismo, la cual no se abordó en esta tesis por cuestiones de tiempo.

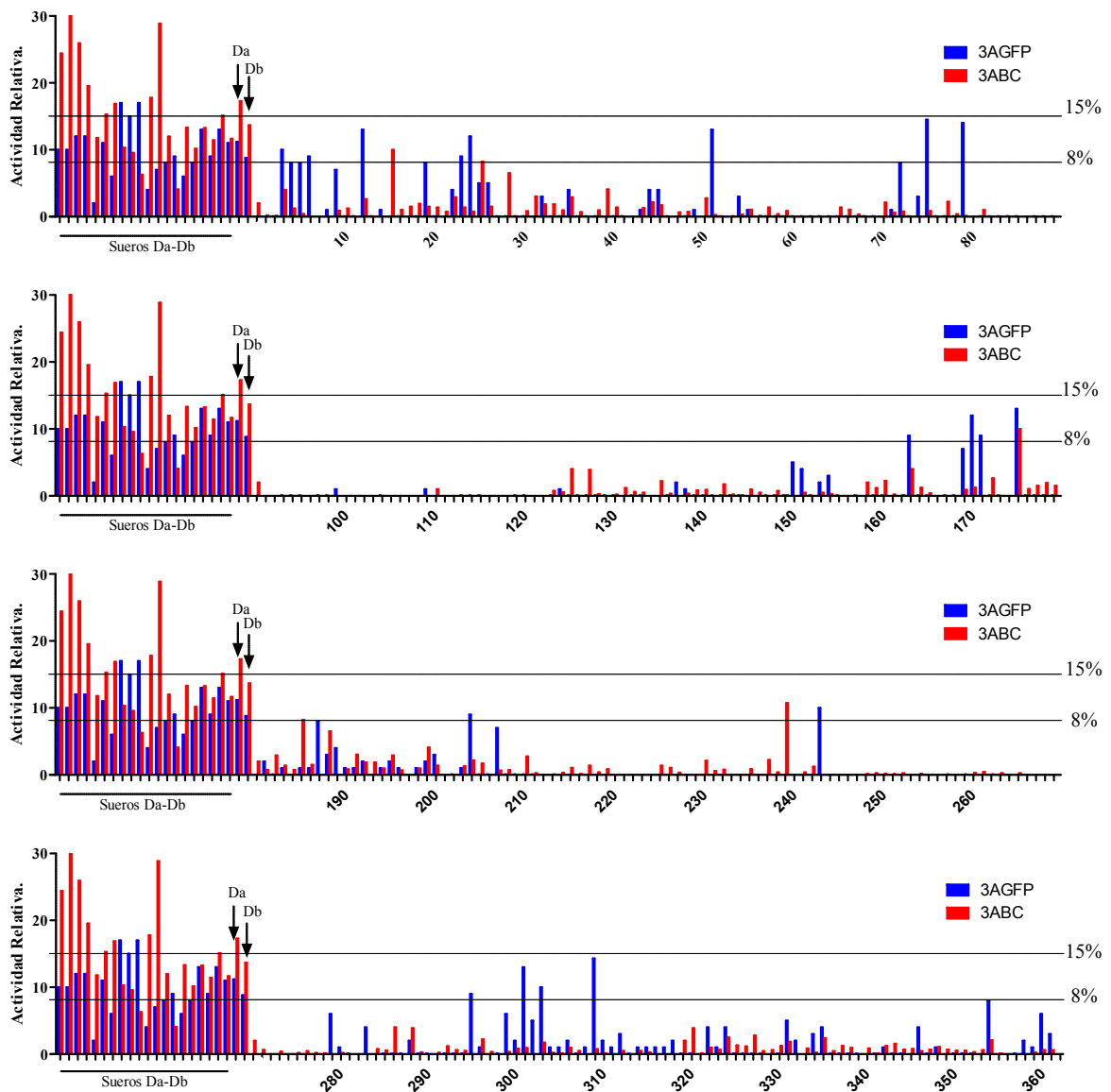


Figura 51. Perfil de inmunoreactividad de 363 sueros de bovinos vacunados no infectados con VFA. Las barras azules y rojas representan valores sueros individuales en AR obtenidos con 3AGFP y 3ABC respectivamente. Las barras AR de sueros positivos débiles (Da - Db) subrayadas son valores de 10 ensayos independientes y las flechas paralelas son los valores de sus medias. La media de valores del total de las 363 muestras, con 3AGFP y 3ABC fueron 1,5% y 0,8% respectivamente. La línea negra inferior de AR del 8% representa el valor de corte tentativo a definir para los sueros negativos libres del VFA, y la línea negra superior de AR del 15% representa el valor de corte tentativo para definir sueros sospechosos.

4.6.2. Análisis de los sueros bovinos mediante Western Blot.

Los sueros Da y Db, provienen de animales que presentaron síntomas de la enfermedad y fueron positivos en EITB, se encuentran en el límite de detección del test

3ABC-ELISA. Por esta razón, se analizaron estos sueros mediante Western Blot, junto a algunos sueros positivos.

Se realizó la corrida en gel de poliacrilamida 12% de las proteínas en cuerpos de inclusión sin purificar (1µg) de: 3ABC (provista en el kit), 3A-GFP y GFP-GST. Se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, y se cortaron tiras de 3 calles conteniendo 3ABC, 3A-GFP y GFP-GST, para ser incubadas con los distintos sueros bovinos y controles.

Como se mostró anteriormente, para una primera caracterización, se utilizaron los sueros Pa (positivo fuerte bovino) y anti-3A 3H7 (monoclonal), los cuales detectan 3ABC y 3A-GFP; el control anti-GFP que nos muestra 3A-GFP y GFP-GST, y el suero Na (*pool bovino naïve*) (Figura 45).

Posteriormente se analizaron por la misma técnica los sueros positivos débiles Da y Db. Cuando la membrana del Western blot se sobreexpuso, se visualizó una tenue banda en ambos sueros (Figura 52), perteneciente a la proteína 3A-GFP, pero no se observó ninguna en la calle de 3ABC. Tal vez a causa de la degradación de 3ABC por la actividad remanente de la proteasa 3C que se observa con suero Pa y el anticuerpo 3H7 (Figura 45 calle 1).

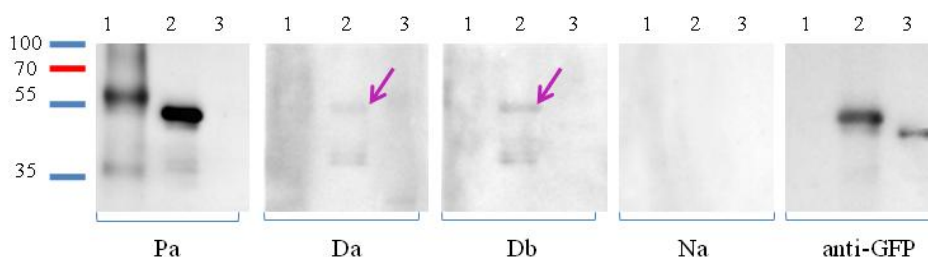


Figura 52. Análisis por Western blot de sueros positivos débiles. SDS-PAGE sembrado con la proteína 3ABC (calles 1); con la proteína 3A-GFP (calles 2), y con la proteína GFP-GST (calles 3). Debajo de los paneles se señalan los sueros controles con los que se reveló cada membrana. Las flechas indican la banda de la proteína 3A-GFP detectada con los sueros positivos débiles Da y Db.

Con estos datos podemos confirmar, que el test 3AGFP-ELISA, está detectando a los sueros positivos débiles manera eficiente. Ya que ambos pueden detectarse utilizando la misma proteína 3A-GFP, y no hay detección en la calle GFP-GST como era esperado.

Por otro lado, se analizó la detección de 3A-GFP vs GFP-GST, por los controles bovinos Pa, Pb, Pc, Pf, Da y Db, y el control negativo Na (Figura 53).

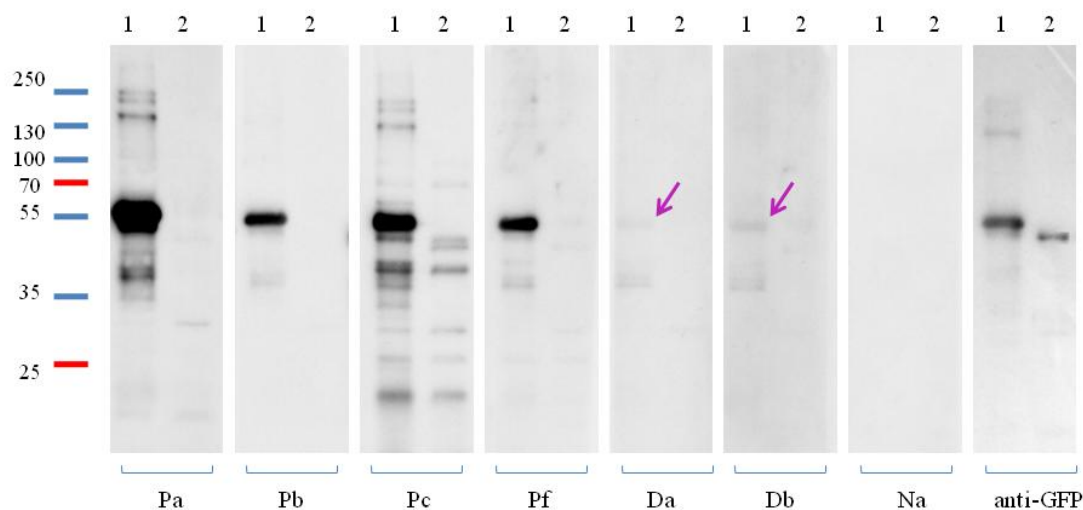


Figura 53. Análisis por Western blot de sueros positivos. SDS-PAGE sembrado con la proteína 3A-GFP (calles 1), y con la proteína GFP-GST (calles 2). Analizado por Western blot con los sueros bovinos que se indican de bajo de cada panel. Las flechas indican una banda débil detectada por los sueros Da y Db.

En la Figura 53 las calles pertenecientes al suero Pc, que proviene de un animal inmunizado con cuerpos de inclusión 3ABC no purificados, se detectan proteínas bacterianas. En cuanto a los sueros, Pa, Pb y Pf, se observa una banda definida que marca la proteína 3A-GFP, en especial el suero Pa, siendo el más fuertemente positivo de todos. Mientras que los sueros positivos débiles Da y Db, como también observamos en la Figura 51 detectan débilmente a 3A-GFP. Estos datos concuerdan, con la caracterización realizada de los sueros positivos en el 3AGFP-ELISA graficada anteriormente en la Figura 48.

4.7. Mapeo del anticuerpo monoclonal 3H7

El Ac. monoclonal 3H7 producido en nuestro Instituto, utilizado para el 3ABC-ELISA, se conformó como una herramienta indispensable para el diagnóstico de circulación del VFA, especialmente para discriminar animales vacunados de convalecientes o infectados. El mismo se obtuvo a partir de la inmunización de ratones con la proteína recombinante 3ABC (Capozzo y cols., 2002; Robiolo y cols., 2006). Se suponía que el mismo estaba dirigido a un epítipo ubicado en la porción 3A, hecho nunca demostrado experimentalmente y que podría explicar los resultados obtenidos con el 3AGFP-ELISA. Teniendo en cuenta que la identificación de una porción de 3A que contenga dicho epítipo puede ofrecer además la posibilidad de mejorar esta nueva metodología, se decidió proceder al mapeo del mismo.

Se utilizó un plásmido existente en el Instituto conteniendo los genes codificantes para las proteínas no estructurales 3A, 3B y 3C (3ABC), en el vector de expresión pET-30a. El segmento 3ABC utilizado aquí contiene una mutación puntual en el sitio activo de la proteasa 3C que neutraliza la actividad autoprocetadora de 3ABC (pET-30a[3ABC]), clon al que se le dio el nombre de clon A (Capozzo y cols., 2002).

Se realizaron 6 deleciones secuenciales en el extremo 5' del segmento 3ABC. Los fragmentos, que difieren aproximadamente en 60 pares de nucleótidos, fueron clonados también en pET-30a, a partir del clon A, dando lugar a los clones que se denominaron B, C, D, E, F y G (Figura 21, M&M).

Las proteínas fueron expresadas en bacterias BL21(DE3) transformadas con los clones obtenidos e inducidas con IPTG. Simultáneamente se transformó y expresó un plásmido pET-30a vacío como control negativo. Como siguiente paso, se realizó una separación por SDS-PAGE 10% y se visualizaron las bandas proteicas por tinción con Coomassie Blue. Luego de observar la expresión obtenida, se realizó una nueva separación en SDS-PAGE 10% por duplicado y se transfirió a membranas de nitrocelulosa las que fueron evaluadas por Western blot con anticuerpos monoclonales anti-3A (3H7) y anti-3C (Figura 54).

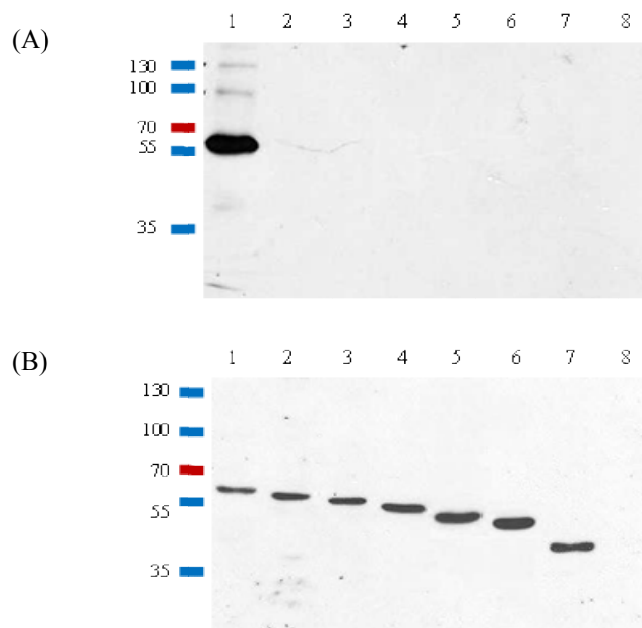


Figura 54. Expresión de deleciones seriadas de la poliproteína 3ABC. Western Blots en los cuales se sembraron en las calles del 1 al 8, los péptidos A, B, C, D, E, F, G y control negativo (pET-30a). Las membranas fueron reveladas con: (A) Ac. monoclonal 3H7. (B) Ac. monoclonal anti-3C.

Los resultados del revelado con 3H7 muestran que el epítipo que reconoce este anticuerpo se encuentra en los primeros 19 aminoácidos de la proteína 3A. Como

control, el anticuerpo monoclonal anti-3C revela la presencia de todos los péptidos ensayados.

La secuencia del péptido de 19aa reconocido es:

ISIPSQKSVLYFLIEKGQHEAAIEFFEG

Para definir mejor la extensión del epítipo, se sintetizaron tres péptidos superpuestos de la región y uno adicional, del mismo tamaño, pero con una secuencia no relacionada (Tabla 2).

Tabla 2. Péptidos sintéticos.

1	ISIPSQKSVL
2	QKSVLYFLI
3	YFLIEKGQH
4	LQKMVMGNT

Se diseñaron varios esquemas de ELISA indirecto, utilizando distintas concentraciones de péptidos pegados a las placas, individualmente o combinados, y utilizando como detector el monoclonal 3H7, obteniéndose en todas las condiciones resultados negativos. Este resultado puede deberse a que las regiones analizadas, independientemente de su secuencia, no son lo suficientemente grandes como para que el epítipo adopte la conformación reconocida por 3H7. Es así que se procedió a la construcción de nuevos clones, fusionados a EGFP. Las construcciones diseñadas se representan en la Figura 22 (M&M), y contienen: (i) los 19aa N-terminales de 3A (p19-GFP), que se encuentran en el clon A; (ii) los 29aa N-terminales, 19aa del clon A, más 10 aa pertenecientes al clon B (p29-GFP), (iii) 38aa N-terminales, todos pertenecientes al clon A y B (p38-GFP); (iv) contiene la proteína 3A completa fusionada a GFP (p3A-GFP).

Las proteínas fusionadas a GFP y el plásmido pGEX-2T[GFP] (Tesis doctoral, Romanutti, 2012), como control negativo, fueron expresadas en bacterias BL21(DE3). Nuevamente se realizó una separación en SDS-PAGE 10% y las bandas se visualizaron por tinción con Coomassie Blue. Luego de observar la expresión obtenida, se realizó un nuevo SDS-PAGE 10%, por duplicado, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa las que fueron evaluadas por WB por medio de los anticuerpos anti-GFP (conejo) y anti-3A (monoclonal 3H7) (Figura 55)

En la imagen del WB, se observa que la proteína 19-GFP no es detectada por el anticuerpo 3H7 pero sí por el anti-GFP, concluyendo que los primeros 19aa N-

terminales de la proteína 3A no son suficientes para abarcar todo el epítipo. Tanto 29-GFP, 38-GFP como 3A-GFP son detectadas por ambos anticuerpos.

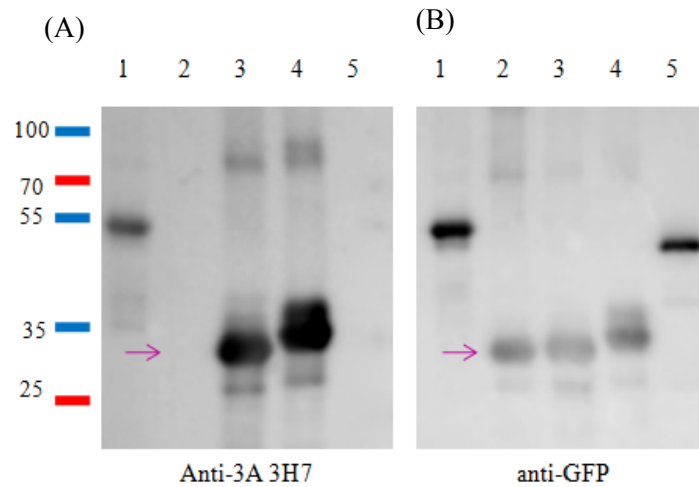


Figura 55. Análisis de la reactividad de péptidos derivados de 3A con el Ac. monoclonal 3H7. Western blot revelado con anti-3A 3H7 (A) o anti-GFP (B) Calle: 1) 3A-GFP, 2) 19-GFP, 3) 29-GFP, 4) 38-GFP, 5) GFP-GST. La flecha en la imagen de la izquierda, indica la proteína 19-GFP, que no es detectada, por el anticuerpo monoclonal 3H7, pero es detectada por anti-GFP en la imagen de la derecha.

De estos resultados se puede concluir que el epítipo de 3H7 se encuentra ubicado dentro de los primeros 29 aa de la región N-terminal de la proteína 3A.

4.8. Reconocimiento de péptidos derivados de la proteína 3A por sueros bovinos en ensayos de ELISA

Con el objetivo de analizar el comportamiento de los péptidos derivados de 3A en ELISA indirecto. Se sensibilizó una placa con 19-GFP, 29-GFP, 38-GFP y 3A-GFP. Se utilizó la fusión GFP-GST como control de *background*. Realizando los pasos siguientes de igual forma que para el 3AGFP-ELISA.

En la Figura 56 se muestran los resultados del ELISA indirecto, los mismos sugieren que la proteína 3A completa fusionada a GFP, es un buen antígeno para reconocer sueros de individuos infectados con el VFA. En cambio, los péptidos conteniendo de 19 a 38 aa de 3A no aparecen aptos para utilizar como detección de anticuerpos bovinos contra 3A. Como controles se utilizó el anticuerpo anti-GFP, revelado con un conjugado anti-conejo, que identifica a todos los péptidos y por otro lado, el anticuerpo monoclonal 3H7, revelado con un conjugado anti-ratón que identifica todos los péptidos, con excepción del de 19aa y el control GFP-GST (Anexo III). En la Figura se muestran los datos correspondientes a la dilución 1:100. Los datos

de la dilución 1/40 presentaron un *background* alto y los resultados de la dilución 1/200, fueron muy similares a la de 1/100.

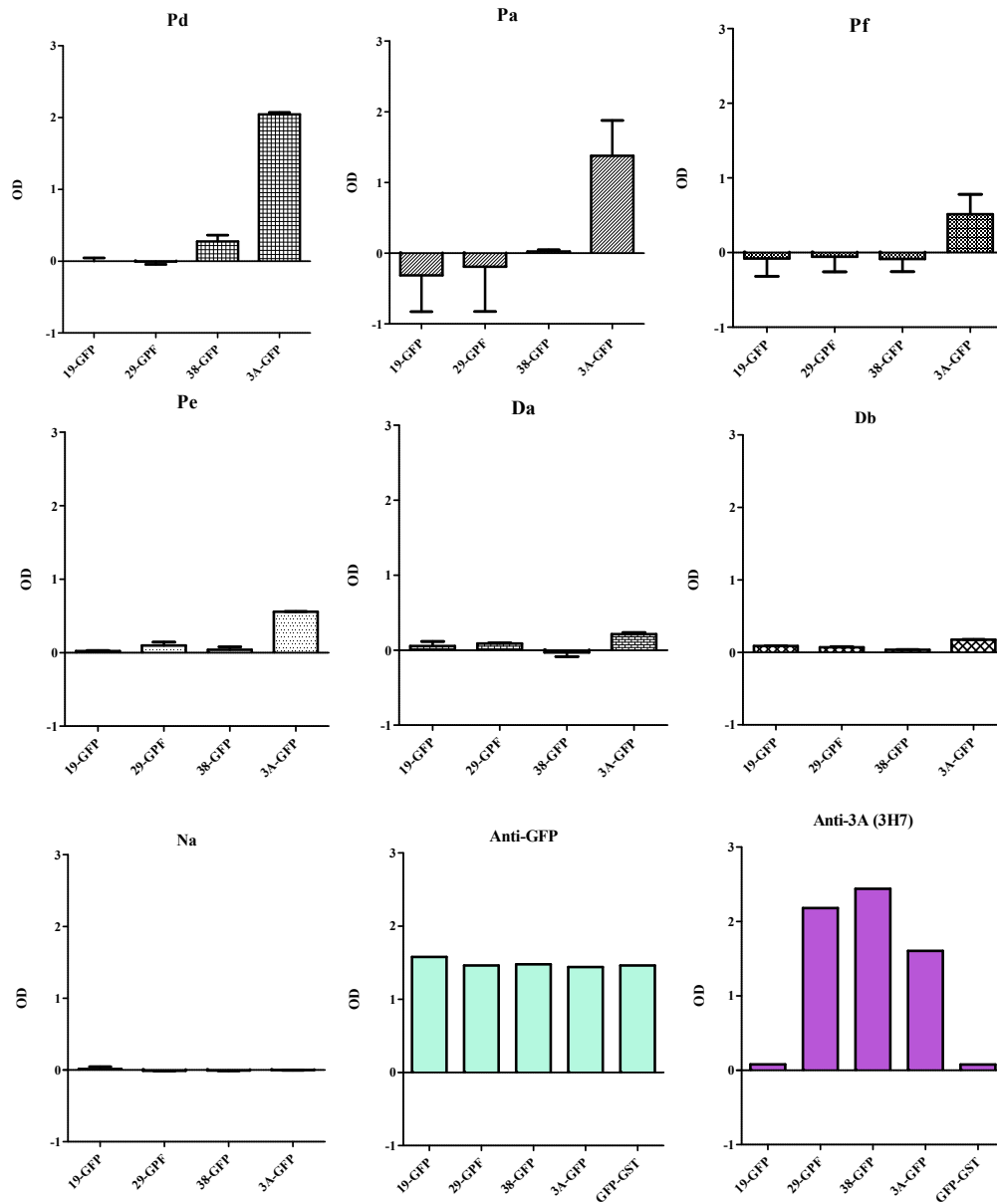


Figura 56. ELISA indirecto para la evaluación de péptidos N-terminales de 3A fusionados a GFP. Placas sensibilizadas con péptidos unidos a GFP. Sueros bovinos (dilución 1:100) según se indica en cada panel, incluyendo controles positivos altos (Pa y Pd), intermedios (Pf y Pe), débiles (Da y Db) y negativo (Na); anti-GFP y anti-3A como controles.

Discusión y Conclusiones

5. Discusión

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar algunos aspectos de la función de la proteína no capsidal 3A del Virus de la Fiebre Aftosa. Esta proteína ha sido más estudiada en otros picornavirus, es especial en PV, habiéndosele asignado funciones importantes.

La estrategia utilizada se basó en la introducción de mutaciones de delección o mutaciones puntuales en la región aminoterminal de la proteína, incluida la región hidrofóbica propuesta como transmembrana, y la consiguiente evaluación del efecto sobre la actividad de replicación del ARN genómico viral.

La metodología empleada consistió en optimizar un replicón del genoma completo del VFA, reemplazando las proteínas capsidales por un gen reportero. El sistema defectivo evita el manejo de material infeccioso, que de otro modo debería trabajarse el alta bioseguridad (NBS3A o 4 OIE) y por otro lado aporta sensibilidad ya que permite la medición eficiente de pequeñas diferencias de actividad, aun cuando las mutaciones no sean permisivas para generar partículas infecciosas.

El primer objetivo del presente trabajo fue logrado al obtener la construcción de un Replicón del VFA, cepa O1/Campos (pRep), conteniendo todas las PNC virales incluida Lpro, con capacidad de transcripción/replicación medible a través de la actividad de Luciferasa. Estudios previos en el caso del VFA fueron realizados por Mason y cols. (2002) quienes reemplazaron toda la zona de proteínas capsidales por el gen de beta-galactosidasa, y por otros investigadores que reemplazaron distintas porciones de la misma por el gen CAT (cloranfenicol acetil-transferasa), (McInerney y cols., 2000; McInerney y cols., 2000). En todos estos casos se delecionó Lpro.

Otro replicón del VFA que codifica el gen reportero CAT fue creado basado en el genoma de la cepa O1/Kaufberuren/FRG/66 tipo O (Forss y cols., 1984). En este caso, la mayor parte de la secuencia que codifica a Lpro fue deletada, al igual que las proteínas capsidales VP4 y VP2, y poco más de la mitad de VP3 (McInerney y cols., 2000). Recientemente, investigadores del mismo grupo (Tulloch y cols., 2014), reemplazaron el gen CAT por una proteína bifuncional aportando fluorescencia y resistencia a antibiótico (*Green Fluorescent Protein /Puromycinresistance*, GFP-PAC). Luego de transfección de células BHK-21 con transcriptos ARN derivados del replicón, observaron que la replicación era fácilmente detectada por fluorescencia, mientras que

la señal desde las formas incompetentes del genoma (un replicón con la proteína 3D deletada) fue 2 veces más baja (Tulloch y cols., 2014).

El sistema logrado en el presente trabajo, utilizando Luciferasa, es mucho más sensible, ya que el replicón con 3A_{wt} (pRep) aporta entre 5 y 10 veces más luz que la forma incompetente o defectiva pRepD2. Esto genera un margen mucho más amplio para detectar pequeños cambios en la replicación del sistema generado por los mutantes a evaluar. Por otro lado, se logró una marcada diferencia entre pRep y pRepD2, por la utilización de ADN en vez de ARN, siendo mucho más eficiente la cotransfección de los clones con el plásmido que aporta la T7pol (pCAT7). De esta manera también se evita la transcripción *in vitro*, la cual además tener un rendimiento bajo y variable en cantidad de ARN transcripto, posee una actividad de Luciferasa inicial, que no se observa cuando se utilizan los correspondientes plásmidos (1 hs, Figura 24).

La disponibilidad de un replicón incapaz de generar viriones, pero que permite medir la actividad de un gen reportero incorporado en el *background* genómico del VFA, posibilita evaluar los efectos de modificaciones en las proteínas virales o en las zonas no codificantes del genoma en un contexto similar a una infección viral, sin los riesgos asociados a la manipulación del virus. También, representa una ventaja sobre los estudios en el marco de un clon infeccioso, en el sentido que puede aportar información sobre dominios proteicos que afectan a la replicación, pero que no generarían virus viables. Esta herramienta demostró poseer una importante sensibilidad para estudiar la replicación del ARN del VFA en forma cuantitativa.

5.1. Evaluación de mutantes de la proteína 3A en la región N-Terminal.

Evidencias previas, indican que la proteína 3A juega un rol importante en la replicación viral. Rosas y cols. (2008) reportaron que en células BHK-21 con expresión estable de las proteínas 3A, 3AB o 3ABBB posteriormente infectadas con el VFA, aumenta la replicación viral, incluyendo un incremento en la formación de placas y títulos virales (Rosas y cols., 2008). La proteína 3A es la proteína viral que presenta el menor número de residuos conservados en su secuencia (37%). Junto con Lpro, y 3B exhiben una variabilidad comparable a las proteínas capsidales VP2, VP3 y VP4, sugiriendo que está sujeta a marcados procesos selectivos (Carrillo y cols., 2005). Sin embargo, tanto el dominio hidrofóbico como el hidrofílico ubicados en el extremo N-terminal de la proteína 3A se encuentran altamente conservados en la mayoría de las

cepas de VFA (Fry y cols., 2005) y la mayoría de las mutaciones y deleciones ocurren en la región C-terminal en todas las variantes (revisión en Gao y cols., 2016)).

Algunas sustituciones o deleciones de aminoácidos en 3A han sido asociadas con el cambio de hospedador y tropismo del VFA (Beard y Mason, 2000; Nuñez y cols., 2001). Por ejemplo, la sustitución del aminoácido Q44 por R es suficiente para conferir a la cepa del VFA C-S8c1 la adaptación a cobayos (Nuñez y cols., 2001). Gonzalez-Magaldi y cols. (2012) crearon un modelo molecular del N-terminal de la proteína 3A del VFA, usando como template la estructura reportada para PV. Este modelo predice interacciones hidrofóbicas entre residuos de las dos alfa-hélices en cada monómero como determinantes centrales de la homodimerización (Gonzalez-Magaldi y cols., 2012). Se demostró que los aminoácidos reemplazados en L38E y L41E, localizados en la interface teórica de dimerización, disminuyen la dimerización de 3A expresada transitoriamente en células y suprime la formación de péptidos dímeros/multímeros (Gonzalez-Magaldi y cols., 2012). Los mismos autores generaron clones infecciosos que contenían las sustituciones Q44R y Q44E que afecta la interacción polar, observando que estas sustituciones, no irrumpen la formación del dímero. Pero mientras que con la mutación Q44R se recobró virus infectivo, con Q44D se generó la sustitución D44E, el cual cambia la carga, pero presenta características similares a Q, sugiriendo que el residuo Q44, a pesar de no ser esencial para la dimerización de 3A, está involucrado en funciones biológicas relevantes para la multiplicación del virus (Gonzalez-Magaldi y cols., 2012). Otras investigaciones previas reportaron modificaciones en donde los clones infecciosos fueron no viables (Behura y cols., 2016), por lo que se considera que es una zona funcional importante para el VFA.

En base a esta información, se propuso profundizar el estudio de la región N-terminal de la proteína 3A del VFA en el contexto de nuestro sistema replicón, el cual permite detectar diferencias sutiles en la replicación y a su vez, evaluar si estos mismos cambios se traducen en diferencias en la ubicación celular o asociación a membranas internas.

Las mutantes de deleción pRep Δ 6-11 y pRep Δ 6-17 presentaron actividades de Luciferasa similares a pRep3A $_{wt}$, sugiriendo que la región comprendida entre los aa 6 a 17 de 3A sería dispensable para la funcionalidad del mismo. Por el contrario, pRep Δ 6-23 presentó una marcada disminución en dicha actividad, indicando un probable requerimiento de los aa 18 a 23 de 3A para la replicación (Figura 29).

Basados en estos resultados, se procedió a analizar en particular algunos aminoácidos de 3A que resultaban importantes para el sistema, reemplazándolos por el aminoácido alanina (A), el cual es pequeño y de carga neutra. Se trabajó con dos clones, el primero, pRepQ18A/H19A/E20A, conteniendo 5 alaninas en la zona de interés (aa 18 al 22); y el segundo, pRepE20A, con un reemplazo puntual del ácido glutámico de la posición 20 (E20), con carga negativa. Tanto pRepQ18A/H19A/E20A como pRepE20A presentaron una disminución significativa de actividad, similar a la obtenida con la delección completa pRep Δ 6-23 (Figura 30).

Se evaluó también la ubicación intracelular de la proteína mutante 3A Δ 6-23, pudiéndose notar diferencias en la formación de gránulos y la localización con respecto al complejo de Golgi, con respecto a 3A*wt*. La proteína portando la delección 6-23, forma gránulos muy pequeños, apenas visibles por microscopía confocal, comparado con los gránulos perinucleares formados por 3A*wt* (Figura 38 y 39), como ya fue descrito anteriormente por O'Donnell y Garcia-Briones (O'Donnell y cols., 2001, Garcia-Briones y cols., 2006). Esta disposición en vesículas membranosas, con apariencia de gránulos, aumentan en tamaño cuando 3A se encuentra unida a EGFP, desconociéndose en que medida esto pueda estar asociado al mayor tamaño del producto proteico. En cuanto a la evaluación de la localización de las proteínas mutantes, 3A Δ 6-23 se observó en forma diseminada en el citoplasma celular sin formar gránulos y superpuesta en su ubicación con el marcador del Complejo de Golgi, mientras que 3A *wt*, se encontró formando gránulos que no colocalizan con Golgi.

Por microscopia confocal se observó también una colocalización parcial con Golgi de la mutante p Δ 6-23F, en relación a la proteína *wt*. Sin embargo, esta colocalización parcial con Golgi, también fue descrita para proteínas 3A*wt* (Garcia-Briones y cols., 2006), por lo que podría no ser significativa y tratarse de un artefacto de la técnica.

Estudios recientes, mostraron que 3A interactúa con la proteína DCTN3 (Dynactin 3), una subunidad del complejo dinactina que actúa como cofactor para la dineína que es la base motora de los microtúbulos. El dúplex dineína-dinactina, ha sido implicado en varias funciones subcelulares importantes (Egan y cols., 2012). Las regiones involucradas comprenden los aa 15-21 y 64-77 de la proteína 3A (Gladue y cols., 2014). La mutante 3A Δ 6-23, posiblemente podría también afectar dicha interacción, pero esto no fue investigado en este trabajo.

5.2. Evaluación de una mutante de la proteína 3A con una delección en la región propuesta como transmembrana

Como se ha comentado, Gonzalez-Magaldi y cols.(2014) proponen, que topológicamente 3A del VFA, correspondería a una proteína no integral de membrana (Gonzalez-Magaldi y cols., 2014), aunque por otro lado se ha postulado como responsable de la unión a membranas del complejo replicativo del VFA en células infectadas (Forss y cols., 1984; Moffat y cols., 2005). En estudios de expresión transiente, se encontró que la proteína 3A se localiza en pequeñas vesículas citoplasmáticas (O'Donnell y cols., 2001; Garcia-Briones y cols., 2006), lo que es consistente con lo que ha sido observado en el presente trabajo.

No se han encontrado en la literatura trabajos previos en donde se evalúe la región hidrofóbica sin deleccionar alguna región adyacente a ella, ya sea hacia el C- o el N-terminal. Por lo cual se planteo deleccionar únicamente esta región transmembrana, y estudiar los efectos tanto en la ubicación intracelular, como en la participación en la replicación. Para ello, se reemplazaron aminoácidos de dicha región en el sistema replicón por 8 alaninas (pRep Δ TM), y se construyó también un plásmido de expresión transitoria (p Δ TMF) con los mismos cambios.

El trabajo con el clon pRep Δ TM permitió observar que la proteína 3A sin esta zona hidrofóbica es totalmente disfuncional, y anula la replicación del sistema (Figura 31). Por otro lado, se detectó claramente, que la proteína sin la región teórica transmembrana (p Δ TMF), deja el citoplasma celular, y se ubica en el núcleo de la célula (Figuras 38, 39, 40 y 41 panel C).

La presencia de una secuencia de localización nuclear (SLN) en una proteína puede resultar en el transporte de la proteína dentro del núcleo. El SLN clásico está generalmente compuesto por un tramo corto de aminoácidos básicos (generalmente 5 aa) o bien, por dos tramos cortos (menos de 5 aa) separados por una región espaciadora de aproximadamente 10 aa (SLN bipartita). Esta señal debe ser expuesta en la conformación correcta para ser accesible a la maquinaria de transporte (Schwoebel y Moore, 2000). Analizando nuevamente la secuencia proteica del mutante 3A Δ TM, se pudieron identificar dos secuencias similares a la descrita por Hyun-Jin Do y cols. (Do y cols., 2006) y que cumplen con los requisitos de una SLN típica al realizarle la delección de la zona propuesta transmembrana (Schwoebel y Moore, 2000). Estos motivos, comprendidos entre los aa 49-56 (**KRAFKRLK**) conteniendo 5 aa básicos (resaltados en negrita), y los aa 77-84 (**RETRKRQK**) conteniendo otros 5 aa básicos, se

encontrarían a menor distancia al reemplazar la zona transmembrana (18 aa) por las 8 alaninas, formando una SLN al reducir la región espaciadora entre ambos tramos. También podría deberse a algún cambio conformacional provocado por dicho reemplazo, que deje más accesible estas regiones.

De cualquier modo, con la mutante Δ TM, se pudo corroborar que la secuencia comprendida entre los aa 56 y 76 de la proteína 3A del VFA, estarían involucrados en la ubicación intracelular y en consecuencia con su funcionalidad, dado que sin la zona pTM la proteína 3A pierde el anclaje a membranas celulares citoplasmáticas.

5.3. Importancia de las regiones evaluadas de la proteína 3A.

Una observación interesante es que a lo largo de los experimentos se obtuvieron valores de actividad de Luciferasa de *Renilla* que variaban proporcionalmente según la actividad de pRep y sus mutantes. Posiblemente este hecho se deba a que la proteína Lpro del VFA, cliva el factor de transcripción eIF4G, favoreciendo las vías de traducción mediadas por IRES (contenidas en los transcritos de pRep y pTM1-Renilla) y disminuyendo la traducción de mensajeros celulares (Belsham, 2005; Steinberger y Skern, 2014). Por lo cual, aquellos pocillos en que la replicación es mayor, poseen consecuentemente mayor actividad de Luciferasa de *Renilla*. A su vez, en los ensayos que involucraron Replicones en los cuales la actividad de Luciferasa *firefly* disminuyó marcadamente (pRepD, pRep Δ 6-23 y pRep Δ TM), el factor eIF4G no fue clivado. Este hecho refuerza la hipótesis de la importancia de estas regiones para la replicación en el sistema.

A pesar de los esfuerzos realizados, no se pudo contar para este trabajo con un clon de genoma completo que generara virus infeccioso. Si bien el replicón tiene muchas ventajas ya mencionadas, hubiera sido muy interesante evaluar algunas mutaciones en los viriones. Recientemente, se reportó la evaluación de una serie de nueve deleciones en un clon infeccioso de la cepa del VFA Asia/IND491/1997 truncados en los dominios de dimerización y transmembrana de 3A. De las nueve deleciones, una fue diseñada con la deleción de 3A casi completa (aa 5-149), cuatro fueron limitadas a la mitad C-terminal río abajo del dominio pTM (aa 86-110, aa 101-149, aa 81-149 y aa 82-153), y cuatro fueron diseñadas para afectar de forma individual o conjunta a los dominios pTM y de dimerización en el N-terminal de la proteína 3A (aa 5-54, aa 21-50, aa 21-80 y aa 55-80). Ninguna de las deleciones en el N-terminal fue viable, mientras que las cuatro deleciones en el extremo C-terminal, originaron virus infecciosos en cultivos celulares

(Behura y cols., 2016), lo que confirma lo que ya se sabía de la dispensabilidad de algunas regiones del extremo carboxi terminal de 3A.

5.4. Utilización de la proteína 3A para la detección de anticuerpos marcadores de infección viral en bovinos

El polipéptido no estructural 3ABC ha sido ampliamente utilizado como sonda serológica para la detección de anticuerpos de infección inducida por VFA, independientemente del estado de vacunación y de serotipo implicado. En esta línea, la construcción de una proteína recombinante mutante 3ABC ha sido descrito previamente por investigadores del Centro de Virología Animal y se ha utilizado como sonda serológica en una prueba de ELISA de captura (3ABC-ELISA) basado en el anticuerpo monoclonal (3H7) (Robiolo y cols., 2006). Este ensayo 3ABC-ELISA fue aplicado con éxito por las autoridades sanitarias a lo largo de los brotes de virus de Fiebre Aftosa 2000-2002 en Argentina y hasta la actualidad para realizar los estudios de ausencia de circulación viral a campo. Los que fueron también presentados en las auditorías internacionales. La prueba ha sido utilizada también en el control de calidad de las vacunas comerciales anti aftosa para determinar pureza del antígeno, que debe ser libre de PNC para que los anticuerpos inducidos por la vacunación no interfirieran en los estudios poblacionales de circulación viral

El 3ABC-ELISA tiene un protocolo de varias etapas que requiere el recubrimiento de los pocillos con el anticuerpo monoclonal de captura 3H7, seguido por incubación con un lisado de bacterias que expresa 3ABC, adición de suero de prueba y desarrollo de la señal cromogénica. La captura está destinada a minimizar la presencia de contaminantes bacterianos que reaccionan con anticuerpos no específicos y la reducción de la relación señal / ruido del ensayo. El protocolo también requiere corregir las lecturas de los pocillos de ensayo, restando los pocillos de control paralelo pre-incubados con tampón salino (Figura 46).

El formato relativamente complejo del 3ABC-ELISA estimuló la prueba de un antígeno alternativo en un formato de ELISA indirecto, prescindiendo del anticuerpo de captura, más simple, capaz de proporcionar un método de *screening* más económico, rápido y sencillo de ejecutar. Una amplia bibliografía ya había demostrado que otras proteínas también derivadas de la región P3 del genoma del virus de la fiebre aftosa, entre ellas 3A, son reactivas con los sueros de bovinos convalecientes y tienen potencial como candidatos para la detección de circulación del VFA (Bergmann y cols., 2000;

Mackay y cols., 1998; Clavijo y cols., 2004; De Diego y cols., 1997). Originalmente, la asociación de 3A a un reportero como GFP significaba disminuir su movilidad relativa en el análisis de SDS PAGE y simplificar su identificación y purificación cromatográfica eventual. Vale la pena mencionar que GFP, una proteína con un complejo patrón de plegado (Tsien, 1998), es probable que también contribuya a la estabilidad de la conformación de secuencias heterologas fusionadastanto en el extremo C o N-terminal, de acuerdo con Yantsevichy cols. (2009). Esto permite especular que la presentación apropiada de secuencias 3A fusionadas a GFP podría contribuir a una unión más eficaz a anticuerpos inducidos por la proteína 3A nativa generada en bovinos infectados con VFA.

En este trabajo se expresó una proteína de fusión entre 3A y GFP y se exploró su capacidad como sonda serológica en un ELISA indirecto para diferenciar sueros de bovinos vacunados, infectados y no infectados. El perfil de transferencia de Western Blot (Figura 45) confirmó la expresión de una proteína de fusión (3A-GFP) con el peso molecular esperado (44 a 45 Kd), que reacciona con el Ac. 3H7 y el suero policlonal anti GFP preparado en conejo. La proteína 3A-GFP reaccionó fuertemente con suero de bovino infectado (Figura 45, calle 2, sueros Pa), pero no se detectó reactividad con suero de un animal vacunado no infectado (Figura 45, calle 2, suero Nb₁). La excelente relación de señal a fondo que se muestra en el perfil de transferencia de Western blot sugirió que 3A-GFP podría ser un candidato adecuado como sonda en un inmunoensayo para diferenciar los sueros de animales infectados y no infectados, independientemente del estado de vacunación.

El análisis de 363 muestras de sueros de animales vacunados no infectados tanto por el 3AGFP-ELISA como por el 3ABC-ELISA mostró casi todos los valores de AR por debajo del umbral del 8% en ambos casos. Los ensayos repetidos de sueros positivos débilmente reactivos mostraron valores de AR dentro del intervalo de 8-15%, 5 a 10 veces más altos que los de controles negativos y el valor medio de AR de los 363 bovinos vacunados. Tomados en conjunto, los resultados sugieren que una AR del 8% (Figura 50) podría ser un valor de corte adecuado para clasificar animales vacunados libres de virus de la fiebre aftosa cuando se usa 3AGFP en estudios sero-epidemiológicos. Es importante mencionar que algunos sueros de campo con resultado negativo para 3ABC, sobrepasan el 8% pero ninguno el 15% (Figura 51), encontrándose en el rango definido para los sueros positivos débiles. Esto podría deberse también a un error metodológico en la determinación de la muestra en particular (cabe recordar que

las mediciones fueron únicas), o bien, a muestras positivas débiles que fueron catalogadas como negativas por 3ABC-ELISA. En este segundo caso, el 3AGFP-ELISA, podría estar detectando anticuerpos contra 3A en el suero bovino, que no son detectados por el 3ABC-ELISA. Por lo tanto, se propone que un segundo valor de corte del 15% sería adecuado para identificar sueros sospechosos (Figura 51), a verificar por un ensayo confirmatorio. En un futuro, mediante la evaluación de un número mayor de muestras se podrá calcular la especificidad y sensibilidad en un contexto de validación según las formulas: $\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN}$ y $\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP}$, siendo VP valores positivos, FN falsos negativos, VN valores negativos y FP falsos positivos. Por el contrario, el test 3ABC-ELISA, presenta dos valores de cortes de 15% (sensibilidad 98,6% y especificidad 98,9%), el cual refiere a los sueros libres del VFA, mientras que el 20% se utiliza para diferenciar sueros sospechosos (sensibilidad 96,6% y especificidad 99,6%), (Robiolo y cols., 2006). Estos valores de corte pueden modificarse para aumentar la sensibilidad o la especificidad del test, según sea necesario.

Se podría establecer un rango más amplio entre reactividad positiva a débil positiva para el 3AGFP-ELISA en comparación con el 3ABC-ELISA. De hecho, mientras que se obtuvieron valores de AR similares para sueros positivos débiles (Da y Db) en ambos ensayos, los valores de AR de sueros fuertes positivos Pa y Pb obtenidos con el 3AGFP-ELISA alcanzaron 211,8% y 121,2%, respectivamente, que eran notablemente mayores que los del 3ABC-ELISA (80,6% y 60,0%, respectivamente). Queda por investigar si esto está relacionado con un componente principal anti-3A dentro del total de anti-PNC presente en sueros de bovinos infectados convalecientes. Sin embargo, cabe destacar que el anticuerpo monoclonal de captura 3H7 reconoce un epítopo en los primeros 29 aa N-terminales de 3ABC, dentro de la secuencia 3A (Figura 55). Las señales relativas inferiores obtenidas con el 3ABC-ELISA podrían ser explicadas por interferencia con una fracción significativa de anticuerpos anti-3A presentes en muestras de animales infectados con el VFA. Y esto también podría explicar por qué el 3AGFP-ELISA reconoce como positivos débiles algunos animales de campo vacunados, como fue mencionado anteriormente.

El posterior análisis de los sueros bovinos positivos por 3AGFP-ELISA, por Western blot, confirma que la detección de sueros débiles es eficiente, ya que Da y Db, detectaron la proteína recombinante 3A-GFP tanto en ELISA como en WB (Figuras 50

B y 52 respectivamente). También se comprobó la detección de todos los sueros fuertes (Pa, Pb y Pf) de forma específica (Figura 53).

Desde el punto de vista de la producción, la proteína recombinante 3A-GFP se recupera en proporciones mayores que 3ABC, de acuerdo con el análisis SDS-PAGE de cuerpos de inclusión bacterianos purificados después de la inducción con IPTG (Figura 45). Esta diferencia, muy probablemente explicada por la ausencia de una actividad auto-proteolítica residual asociada a 3C, constituye una ventaja importante para el almacenamiento a largo plazo del recombinante 3A-GFP y su uso final en placas de pocillos múltiples pre-recubiertas de antígeno listas para demanda. Se continuará con la validación del ELISA basado en 3A-GFP, y evaluando el potencial de utilizar un sistema dual de serodiagnóstico basado en un 3AGFP-ELISA simple y rápido para el *screening* inicial seguido de la confirmación de muestras positivas o sospechosas por el ELISA 3ABC y/o EITB ya validados.

6. Conclusiones

- ✓ La región de 3A comprendida entre los aa 18 a 22 y particularmente el ácido glutámico E20 tienen un rol crítico en la replicación viral.
- ✓ Los aa 56 a 76 de 3A están involucrados en la ubicación intracelular de la proteína. Cuando esa zona es mutada, reemplazándola por 8 alaninas, la proteína se localiza en el núcleo de la célula.
- ✓ La proteína 3A deletada en la zona hidrofóbica propuesta como TM es totalmente disfuncional, y anula la replicación del sistema.
- ✓ La mutante puntual pE20A, produce una drástica disminución en la actividad replicativa, aunque no total.
- ✓ Se mapeó el epítipo del anticuerpo monoclonal 3H7 a los primeros 29 aa de la región N-terminal de 3A.
- ✓ Se desarrolló y validó un ensayo de ELISA indirecto utilizando la proteína 3A unida a un péptido carrier (3AGFP-ELISA) apto para *screening* rápido, sensible y específico de circulación viral en bovinos.
- ✓ El 3AGFP-ELISA tiene una excelente correlación con el 3ABC-ELISA que se utiliza actualmente para el control de vacunas y la diferenciación de animales vacunados de infectados.

Anexos

Anexos.

Anexo I: Soluciones.

*** LB (medio Luria-Bertani)**

10g de Triptona; 5g de Extracto de Levadura; 10g de NaCl; Llevar a 1L con agua destilada. Autoclavada para esterilizar.

Para LB-Agar, se agregó 2% de agar a la solución y se armaron las placas.

*** Solución Cloruro de Calcio (CaCl₂)**

60mM CaCl₂; 15% glicerol; 10mM PIPES (piperazine-N,N'-bis(2-hidroxypropanosulfonic acid), pH 7. Autoclavada para esterilizar.

*** Minipreparaciones:**

Solución P1: 25mM Tris.Cl (pH 8.0); 10mM EDTA (pH 8.0) autoclavada 15 min a 101b/sq. Almacenada a 4°C.

Solución P2: 0.2N NaOH (diluir del stock 10N), 1% SDS

Solución P3: Acetato de Potasio 5 M 60ml; Ácido acético glacial 11.5ml, Agua llevado a volumen final de 100ml. Almacenado a -20°C.

***Electroforesis de geles de agarosa:**

Buffer TBE 0,5X : 45 mM Tris-base, 45mM ácido bórico, 1mM EDTA (pH 8.0)

Buffer de siembra 6X: 50% glicerol, 2% azul de bromofenol

*** PBS (pH 7.4):**

137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄. Se llevó al pH requerido. Se almacenó como solución madre PBS 10x

***Inmunofluorescencia Indirecta.**

Formaldehido: Formaldehido 3,7% en PBS

PBS-Tritón: 0,2% Tritón X-100 en PBS

Glicina: Glicina 0,1M disuelta en PBS-Tritón 0.2%

PBS-T-BSA: 3% de BSA en PBS-Tritón 0.2%

DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol): 1µg/ml de DAPI disuelto en PBS

TO-PRO®-3 iodide (Invitrogen): dilución 1/200 en PBS

* **SDS-PAGE:**

Buffer muestra 1X (Tris-HCl 100 mM, pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, Azul de bromofenol 0,2% y DTT 50 mM) + DTT 10x

Geles de Poliacrilamida, buffer de corrida y de transferencia según (Laemmli 1970).

* **Coomassie Blue.**

1g de Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad) disuelto en 1 litro de solución:

Metanol 50%(v/v), Ácido glaciado acético 10%(v/v), H₂O 40%.

Filtrado con papel Whatman. Almacenado a temperatura ambiente.

* **Purificación de Cuerpos de inclusión**

Solución 1: 50mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 100mM NaCl

Solución 1+DOC: 50mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 100mM NaCl, 2mg/ml DOC

Solución 1 + Tritón: 50mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 100mM NaCl, Tritón 100X 0.5%

* **Western Blot**

PBS-T-0.1: PBS conteniendo Tween-20 0.1%

PBS-T-0.1-L: PBS conteniendo Tween-20 0.1% y 3% de leche descremada.

* **ELISA**

Solución de Captura: buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6

PBS-T-0.05: PBS conteniendo Tween-20 0.05%

Solución Dilución (SD): PBS-T0.5 conteniendo 10% de suero equino. Almacenado como SD madre 6x a 4°C.

Solución Dilución Leche (SDL): SD conteniendo 3% leche descremada en polvo.

ABTS/ H₂O₂: ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) se agregó cada 6ml de ABTS 8ul de H₂O₂ antes de usar.

Solución Stop (SS): 0.2% de Fluoruro Sódico (NaF)

AnexoII: Primers.

Denominación	Secuencia 5'-3'
2A.Fow	TCGCCGTGCCCGGGCCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCT
3A.1/2.Rev.	TGAGGGGTCCGAGTTCCTCTTTGAT
Del1.3A.Revers	CAAAGAATTCAATTGCTGCCTCATGTTGGCCTTCTCAATGAGAAAGGAAG GAATTGAGATCTG
Del2.3A.Revers	CAAAGAATTCAATTGCTGCCTCATGTTGGGAAGGAATTGAGATCTG
Del3.3A.Revers	CGTGGACCATGCCCTCAAAGAATTCGGAAGGAATTGAGATCTGCTTG
Mut1.3A.Revers	CTCAAAGAATTCAATTGCTGCTGCTGCTGCGCCCTTCTC
Mut2.3A.Revers	CTCAAAGAATTCAATTGCTGCTGCATGTTGGCCCTTCTC
2B.Fow.PmlI	CTCCAGTCTCTTTCACGTGCCGGCCC
Rev.3A.Δtransm	CTTTC AAGCGCCTGAAGGAAAATGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
Fow.3A.Δtranm	GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTGCAGACTCGCAAGAGGCAGAAA
Fow.3A.EcoRI	GCAATTGAATTCTTTGAGGGC
Rev.3D.MluI	CGGGCGTGACGCGTAGTCAGC
3A.Fow.HindIII.Flag	TCAAGCTTGCCACCATGGACTATAAAGACGATGATTACAAGCAGATCTCA ATTCCTCC
3A.NotI.Rev.	TCGCGGCCGCTTATTCAGCTTGTGGTTGCTCCTCAACAG
3AgreenF	GAAGATCTGCCACCATGATCTCAATTCCTTCCCA
3AgreenR	GACGGATCCTCAGCTTGTGGTTGCTCCTCAACAG
3A.NcoI.FowB	AAGGCCATGGAGGCAGCAATTGAATTCTTTGA
3A.NcoI.FowC	AAGGCCATGGGACCCCTCATCCAACAACTTC
3A.NcoI.FowD	AAGGCCATGGATTTTGAGATTGTTGCTCTGTG
3A.NcoI.FowE	AAGGCCATGGAGACTCGCAAGAGGCAGAAAAT
3A.NcoI.FowF	AAGGCCATGGACATCACCACAGATGACAAGAC
3A.NcoI.FowG	AAGGCCATGGGCGCCAGCACCGTTGGCTTTAG
3A.BamHI.Rev	ATTCGGATCCTCCGTTGCCTCCTGCAGAGTGAG
3A.NcoI.FowA	AAGGCCATGGTCTCAATTCCTTCCCAAAAATC
19.3A.NcoI.Fow	GACCATGGTCTCAATTCCTTCCCAAAAATCTGTGTTGTACTTTCTCATTGAG AAGGGCCAACATATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
Rev.29aa3A.GFP	CAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCATGCCCTCAAAGAATTCAATTGC
GFP.Fow	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACC
Rev.38aa3A.GFP	CAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGAGTTCCTCTTTGATGGAGTCGTG
Rev.3A.GFP	CAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTCAGCTTGTGGTTGCTCCTCAAC

AnexoIII: Anticuerpos.

Anticuerpo	Marca	Catálogo	Técnica	Dilución
Monoclonal 3H7 anti 3A	CEVAN		IFI	1/1000
			ELISA	1/2000
			WB	1/600
Anti-3C 2EII	CEVAN		IFI	1/1000
			WB	1/1000
Anti-FLAG®M2	Sigma-Aldrich™	F3165	IFI	1/1000
Anti-rabbit Alexa Fluor®488	LifeColors (Invitrogen)		IFI	1/500
Anti-mouse Alexa Fluor® 546	LifeColors (Invitrogen)		IFI	1/1000
β-Tubulin Rabbit	Cell Signaling Technology	#2128	IFI	1/100
Calnexin antibody	Cell Signaling Technology	#2433	IFI	1/50
Anti-Giantin antibody	abcam	ab24586	IFI	1/100
GFP Tag Polyclonal Antibody	Invitrogen	A6455	WB	1/2500
			ELISA	1/2000
Anti-mouse IgG HRP Conjugate	Promega		WB	1/10000
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2030	WB	1/5000
			ELISA	1/2000
Horseradish peroxidase- conjugated goat anti- bovine serum	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.		WB	1:10000-1:200000
			ELISA	1:5000-1:100000
Anti-Actina Rabbit	Sigma Chemical Company		WB	1:700
Anti- eIF4G Rabbit	Cell Signalling		WB	1:1000

Bibliografía

Bibliografía

- Abelson, P. H. (1982) Foot-and-mouth disease vaccines. *Science*, 218, 1181.
- Abrams, C. C., A. M. King & G. J. Belsham (1995) Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J Gen Virol*, 76 (Pt 12), 3089-98.
- Acharya, R., E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands & F. Brown (1989) The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337, 709-16.
- Amador, A. 2004. Dinámica estocástica de la epidemia de Fiebre Aftosa. . Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Andino, R., G. E. Rieckhof, P. L. Achacoso & D. Baltimore (1993) Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J*, 12, 3587-98.
- Angell, S. M. & D. C. Baulcombe (1997) Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J*, 16, 3675-84.
- Ao, D., H. C. Guo, S. Q. Sun, D. H. Sun, T. S. Fung, Y. Q. Wei, S. C. Han, X. P. Yao, S. Z. Cao, D. X. Liu & X. T. Liu (2015) Viroporin Activity of the Foot-and-Mouth Disease Virus Non-Structural 2B Protein. *PLoS One*, 10, e0125828.
- Ao, D., S. Q. Sun & H. C. Guo (2014) Topology and biological function of enterovirus non-structural protein 2B as a member of the viroporin family. *Vet Res*, 45, 87.
- Argos, P., G. Kamer, M. J. Nicklin & E. Wimmer (1984) Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picornaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. *Nucleic Acids Res*, 12, 7251-67.
- Armstrong, R. M. (1997) Development of tests for antibodies against foot-and-mouth disease virus in cattle milk. . *J Virol Methods* , 63, 175-180.
- Arnold, E., M. Luo, G. Vriend, M. G. Rossmann, A. C. Palmenberg, G. D. Parks, M. J. Nicklin & E. Wimmer (1987) Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 21-5.
- Bachrach, H. L. 1977. *Foot-and-mouth disease virus. Properties, molecular biology and immunogenicity*. Allanheld, Osmun Co. Montclair.
- 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.
- Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo, N. Pariante, N. Verdaguer & E. Domingo (2003) Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv Virus Res*, 62, 19-111.
- Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo, N. Sevilla, D. Andreu, E. Beck & E. Domingo (2000) Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol*, 74, 1641-7.
- Baranowski, E., N. Sevilla, N. Verdaguer, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Beck & E. Domingo (1998) Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol*, 72, 6362-72.

- Barco, A. & L. Carrasco (1995) A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 14, 3349-64.
- Barteling, S. J. & N. I. Cassim (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.
- Barton, D. J., B. J. O'Donnell & J. B. Flanagan (2001) 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J*, 20, 1439-48.
- Baxt, B. (1987) Effect of lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. *Virus Res*, 7, 257-71.
- Bazan, J. F. & R. J. Fletterick (1988) Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7872-6.
- Beard, C. W. & P. W. Mason (2000) Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 74, 987-91.
- Beck, E., S. Forss, K. Strebel, R. Cattaneo & G. Feil (1983) Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucleic Acids Res*, 11, 7873-85.
- Behura, M., J. K. Mohapatra, L. K. Pandey, B. Das, M. Bhatt, S. Subramaniam & B. Pattnaik (2016) The carboxy-terminal half of nonstructural protein 3A is not essential for foot-and-mouth disease virus replication in cultured cell lines. *Arch Virol*, 161, 1295-305.
- Bekkum, J. G. V. 1969. Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMDV. In *Session of research group of standing technical committee of the European Commission for the control of foot and mouth disease, Brescia, Italy.* , 38-41. Rome: Food and Agriculture Organization (FAO).
- Belov, G. A., Q. Feng, K. Nikovics, C. L. Jackson & E. Ehrenfeld (2008) A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog*, 4, e1000216.
- 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. (2005) Translation and replication of FMDV RNA. *Curr Top Microbiol Immunol*, 288, 43-70.
- Belsham, G. J. & C. J. Bostock (1988) Studies on the infectivity of foot-and-mouth disease virus RNA using microinjection. *J Gen Virol*, 69 (Pt 2), 265-74.
- Belsham, G. J. & J. K. Brangwyn (1990) A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *J Virol*, 64, 5389-95.
- Belsham, G. J., G. M. McInerney & N. Ross-Smith (2000) Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol*, 74, 272-80.
- Bergmann, I. E., P. A. de Mello, E. Neitzert, E. Beck & I. Gomes (1993) Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am J Vet Res*, 54, 825-31.

- Bergmann, I. E., V. Malirat & E. Neitzert (2005) Non-capsid proteins to identify foot-and-mouth disease viral circulation in cattle irrespective of vaccination. *Biologicals*, 33, 235-9.
- Bergmann, I. E., V. Malirat, E. Neitzert, E. Beck, N. Panizzutti, C. Sanchez & A. Falczuk (2000) Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch Virol*, 145, 473-89.
- Berryman, S., E. Brooks, A. Burman, P. Hawes, R. Roberts, C. Netherton, P. Monaghan, M. Whelband, E. Cottam, Z. Elazar, T. Jackson & T. Wileman (2012) Foot-and-mouth disease virus induces autophagosomes during cell entry via a class III phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *J Virol*, 86, 12940-53.
- Berryman, S., S. Clark, P. Monaghan & T. Jackson (2005) Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 79, 8519-34.
- Bienz, K., D. Egger & L. Pasamontes (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.
- Bienz, K., D. Egger, T. Pfister & M. Troxler (1992) Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol*, 66, 2740-7.
- Bolten, R., D. Egger, R. Gosert, G. Schaub, L. Landmann & K. Bienz (1998) Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent In situ hybridization. *J Virol*, 72, 8578-85.
- Boothroyd, J. C., T. J. Harris, D. J. Rowlands & P. A. Lowe (1982) The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Gene*, 17, 153-61.
- Boyer, J. C., G. Dugeon, K. Seron, M. D. Morch-Devignes, F. Agnes & A. L. Haenni (1993) In vitro transcripts of turnip yellow mosaic virus encompassing a long 3' extension or produced from a full-length cDNA clone harbouring a 2 kb-long PCR-amplified segment are infectious. *Res Virol*, 144, 339-48.
- Brocchi, E., I. E. Bergmann, A. Dekker, D. J. Paton, D. J. Sammin, M. Greiner, S. Grazioli, F. De Simone, H. Yadin, B. Haas, N. Bulut, V. Malirat, E. Neitzert, N. Goris, S. Parida, K. Sorensen & K. De Clercq (2006) Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 24, 6966-79.
- Broekhuijsen, M. P., T. Blom, M. Kottenhagen, P. H. Pouwels, R. H. Meloen, S. J. Barteling & B. E. Enger-Valk (1986) Synthesis of fusion proteins containing antigenic determinants of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 4, 119-24.
- Brown, F. (1972) Structure-function relationships in foot-and-mouth disease virus. *Adv Exp Med Biol*, 31, 19-28.
- Brown, J. K., S. M. McAleese, E. M. Thornton, J. A. Pate, A. Schock, A. I. Macrae, P. R. Scott, H. R. Miller & D. D. Collie (2006) Integrin-alphavbeta6, a putative receptor for foot-and-mouth disease virus, is constitutively expressed in ruminant airways. *J Histochem Cytochem*, 54, 807-16.
- Burman, A., S. Clark, N. G. Abrescia, E. E. Fry, D. I. Stuart & T. Jackson (2006) Specificity of the VP1 GH loop of Foot-and-Mouth Disease virus for alphav integrins. *J Virol*, 80, 9798-810.
- Burness, A. T., I. U. Pardoe & S. M. Fox (1973) Evidence for the lack of glycoprotein in the encephalomyocarditis virus particle. *J Gen Virol*, 18, 33-49.

- Burroughs, J. N., D. J. Rowlands, D. V. Sangar, P. Talbot & F. Brown (1971) Further evidence for multiple proteins in the foot-and-mouth disease virus particle. *J Gen Virol*, 13, 73-84.
- Capozzo, A. V., D. J. Burke, J. W. Fox, I. E. Bergmann, J. L. La Torre & P. R. Grigera (2002) Expression of foot and mouth disease virus non-structural polypeptide 3ABC induces histone H3 cleavage in BHK21 cells. *Virus Res*, 90, 91-9.
- Carrillo, C., E. R. Tulman, G. Delhon, Z. Lu, A. Carreno, A. Vagnozzi, G. F. Kutish & D. L. Rock (2005) Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 79, 6487-504.
- Carrillo, E. C., C. Giachetti & R. H. Campos (1984) Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth disease virus replication. *Virology*, 135, 542-5.
- Clavijo, A., E. M. Zhou, K. Hole, B. Galic & P. Kitching (2004) Development and use of a biotinylated 3ABC recombinant protein in a solid-phase competitive ELISA for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*, 120, 217-27.
- Collen, T. 1994. Foot-and-mouth disease aphthovirus: viral T cell epitopes. In *Cell mediated immunity in ruminants.*, ed. M. I. E. God-devis BML, 173-197. CRC Press. Boca Raton.
- Cooper, P. D. (1978) Picornaviridae: second report. *Intervirology*, 10, 165-80.
- Correa Melo, E., V. Saraiva & V. Astudillo (2002) Review of the status of foot and mouth disease in countries of South America and approaches to control and eradication. *Rev Sci Tech*, 21, 429-36.
- Costa Giomi, M. P., I. E. Bergmann, E. A. Scodeller, P. Auge de Mello, I. Gomez & J. L. La Torre (1984) Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in aphthovirus: biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidylic acid tracts of different lengths. *J Virol*, 51, 799-805.
- Cottam, E. M., J. Wadsworth, A. E. Shaw, R. J. Rowlands, L. Goatley, S. Maan, N. S. Maan, P. P. Mertens, K. Ebert, Y. Li, E. D. Ryan, N. Juleff, N. P. Ferris, J. W. Wilesmith, D. T. Haydon, D. P. King, D. J. Paton & N. J. Knowles (2008) Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathog*, 4, e1000050.
- Cottral, G. E. (1969) Persistence of foot-and-mouth disease virus in animals, their products and the environment. *Bull Off Int Epizoot*, 71, 549-68.
- Curry, S., C. C. Abrams, E. Fry, J. C. Crowther, G. J. Belsham, D. I. Stuart & A. M. King (1995) Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol*, 69, 430-8.
- Curry, S., E. Fry, W. Blakemore, R. Abu-Ghazaleh, T. Jackson, A. King, S. Lea, J. Newman, D. Rowlands & D. Stuart (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., E. Fry, W. Blakemore, R. Abu-Ghazaleh, T. Jackson, A. King, S. Lea, J. Newman & D. Stuart (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.
- Chapman, S., G. Hills, J. Watts & D. Baulcombe (1992) Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology*, 191, 223-30.
- Chatterjee, N. K., H. L. Bachrach & J. Polatnick (1976) Foot-and-mouth disease virus RNA. Presence of 3'-terminal polyriboadenylic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology*, 69, 369-77.

- Chinsangaram, J., C. Beard, P. W. Mason, M. K. Zellner, G. Ward & M. J. Grubman (1998) Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J Virol*, 72, 4454-7.
- Choe, S. S., D. A. Dodd & K. Kirkegaard (2005) Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology*, 337, 18-29.
- Chow, M., J. F. Newman, D. Filman, J. M. Hogle, D. J. Rowlands & F. Brown (1987) Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327, 482-6.
- D'Antuono, A., A. S. Laimbacher, J. La Torre, V. Tribulatti, C. Romanutti, P. Zamorano, V. Quattrocchi, E. M. Schraner, M. Ackermann, C. Fraefel & N. Mattion (2010) HSV-1 amplicon vectors that direct the in situ production of foot-and-mouth disease virus antigens in mammalian cells can be used for genetic immunization. *Vaccine*, 28, 7363-72.
- De Diego, M., E. Brocchi, D. Mackay & F. De Simone (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 Felipe, P., L. E. Hughes, M. D. Ryan & J. D. Brown (2003) Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem*, 278, 11441-8.
- de Jong, A. S., F. de Mattia, M. M. Van Dommelen, K. Lanke, W. J. Melchers, P. H. Willems & F. J. van Kuppeveld (2008) Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *J Virol*, 82, 3782-90.
- de Los Santos, T., F. Diaz-San Segundo & M. J. Grubman (2007) Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J Virol*, 81, 12803-15.
- Deitz, S. B., D. A. Dodd, S. Cooper, P. Parham & K. Kirkegaard (2000) MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13790-5.
- Dellers, R. W. & J. L. Hyde (1964) Response of Sheep to Experimental Infection with Foot-and-Mouth Disease Virus. *Am J Vet Res*, 25, 469-73.
- Devaney, M. A., V. N. Vakharia, R. E. Lloyd, E. Ehrenfeld & M. J. Grubman (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.
- Dicara, D., A. Burman, S. Clark, S. Berryman, M. J. Howard, I. R. Hart, J. F. Marshall & T. Jackson (2008) Foot-and-mouth disease virus forms a highly stable, EDTA-resistant complex with its principal receptor, integrin alphavbeta6: implications for infectiousness. *J Virol*, 82, 1537-46.
- Do, H. J., H. Song, H. M. Yang, D. K. Kim, N. H. Kim, J. H. Kim, K. Y. Cha, H. M. Chung & J. H. Kim (2006) Identification of multiple nuclear localization signals in murine Elf3, an ETS transcription factor. *FEBS Lett*, 580, 1865-71.
- Doedens, J. R., T. H. Giddings, Jr. & K. Kirkegaard (1997) Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol*, 71, 9054-64.
- Doedens, J. R. & K. Kirkegaard (1995) Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J*, 14, 894-907.
- Domingo, E., C. Escarmis, E. Baranowski, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Carrillo, J. I. Nuñez & F. Sobrino (2003) Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 91, 47-63.

- Domingo, E., V. Martín, C. Perales, A. Grande-Pérez, J. García-Arriaza & A. Arias (2006) Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 299, 51-82.
- Domingo, E., C. M. Ruiz-Jarabo, S. Sierra, A. Arias, N. Pariente, E. Baranowski & C. Escarmis (2002) Emergence and selection of RNA virus variants: memory and extinction. *Virus Res*, 82, 39-44.
- Drzeniek, R. & P. Bilello (1974) Absence of glycoproteins in poliovirus particles. *J Gen Virol*, 25, 125-32.
- Dunn, C. S. & A. I. Donaldson (1997) Natural adaptation to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet Rec*, 141, 174-5.
- Echeverri, A. C. & A. Dasgupta (1995) Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology*, 208, 540-53.
- Egan, M. J., K. Tan & S. L. Reck-Peterson (2012) Lis1 is an initiation factor for dynein-driven organelle transport. *J Cell Biol*, 197, 971-82.
- Ellard, F. M., J. Drew, W. E. Blakemore, D. I. Stuart & A. M. King (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., J. Dopazo, M. Davila, E. L. Palma & E. Domingo (1995) Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus Res*, 35, 155-67.
- Escarmis, C., M. Toja, M. Medina & E. Domingo (1992) Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res*, 26, 113-25.
- F Ausubel, R. B., R Kingston, D Moore, J Seidman, J Smith, K Struhl. 2003. *Current Protocols In Molecular Biology*.
- Falk, M. M., P. R. Grigera, I. E. Bergmann, A. Zibert, G. Multhaupt & E. Beck (1990) Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J Virol*, 64, 748-56.
- Falk, M. M., F. Sobrino & E. Beck (1992) VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 66, 2251-60.
- Fauquet C. , M. M., Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, y (Eds.). 2005. "VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses".
- Fenner, F. (1976) Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 7, 1-115.
- Ferrer-Orta, C., R. Agudo, E. Domingo & N. Verdaguer (2009) Structural insights into replication initiation and elongation processes by the FMDV RNA-dependent RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol*, 19, 752-8.
- Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Agudo, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo & N. Verdaguer (2006a) The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J*, 25, 880-8.
- Ferrer-Orta, C., A. Arias, C. Escarmis & N. Verdaguer (2006b) A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*, 16, 27-34.
- Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo & N. Verdaguer (2004) Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem*, 279, 47212-21.
- Ferrer-Orta, C., D. Ferrero & N. Verdaguer (2015) RNA-Dependent RNA Polymerases of Picornaviruses: From the Structure to Regulatory Mechanisms. *Viruses*, 7, 4438-60.

- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. 2009. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control, 3rd edn. . In *Principles of Virology.*, ed. A. Press. Washington, D.C.:
- Forman, A. J., E. P. Gibbs, D. J. Baber, K. A. Herniman & I. T. Barnett (1974) Studies with foot-and-mouth disease virus in British deer (red, fallow and roe). II. Recovery of virus and serological response. *J Comp Pathol*, 84, 221-9.
- Forss, S., K. Strelbel, E. Beck & H. Schaller (1984) Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res*, 12, 6587-601.
- Foscaldi, S. A. 2016. Estudio de los determinantes moleculares involucrados en la traducción de los ARN mensajeros de arenavirus. Buenos Aires, Argentina.: Universidad de Buenos Aires.
- Fracastoro, G. (1546) De contagione et contagiosis morbis et curatione
- Francis, M. J., C. M. Fry, D. J. Rowlands, F. Brown, J. L. Bittle, R. A. Houghten & R. A. Lerner (1985) Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 66 (Pt 11), 2347-54.
- Fry, E. E., D. I. Stuart & D. J. Rowlands (2005) The structure of foot-and-mouth disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 288, 71-101.
- Gamarnik, A. V. & R. Andino (1998) Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev*, 12, 2293-304.
- Gao, Y., S. Q. Sun & H. C. Guo (2016) Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Viol J*, 13, 107.
- García-Briones, M., M. F. Rosas, M. Gonzalez-Magaldi, M. A. Martín-Acebes, F. Sobrino & R. Armas-Portela (2006) Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells. *Virology*, 349, 409-21.
- García-Nuñez, S., M. I. Gismondi, G. König, A. Berinstein, O. Taboga, E. Rieder, E. Martínez-Salas & E. Carrillo (2014) Enhanced IRES activity by the 3'UTR element determines the virulence of FMDV isolates. *Virology*, 448, 303-13.
- George, M., R. Venkataramanan, B. Pattnaik, A. Sanyal, C. B. Gurumurthy, D. Hemadri & C. Tosh (2001) Sequence analysis of the RNA polymerase gene of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1. *Virus Genes*, 22, 21-6.
- Gerber, K., E. Wimmer & A. V. Paul (2001) Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2A(pro). *J Virol*, 75, 10979-90.
- Giraldez, A. 2013. Diseño de un sistema de genética reversa del virus de la fiebre aftosa. In *Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. Universidad de Buenos Aires.
- Giraud, A. T., E. Beck, K. Strelbel, P. A. de Mello, J. L. La Torre, E. A. Scodeller & I. E. Bergmann (1990) Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology*, 177, 780-3.
- Giraud, A. T., A. Sagedahl, I. E. Bergmann, J. L. La Torre & E. A. Scodeller (1987) Isolation and characterization of recombinants between attenuated and virulent aphthovirus strains. *J Virol*, 61, 419-25.
- Gladue, D. P., V. O'Donnell, R. Baker-Bransetter, J. M. Pacheco, L. G. Holinka, J. Arzt, S. Pauszek, I. Fernandez-Sainz, P. Fletcher, E. Brocchi, Z. Lu, L. L. Rodriguez & M. V. Borca (2014) Interaction of foot-and-mouth disease virus nonstructural protein 3A with host protein DCTN3 is important for viral virulence in cattle. *J Virol*, 88, 2737-47.

- Gonzalez-Magaldi, M., M. A. Martin-Acebes, L. Kremer & F. Sobrino (2014) Membrane topology and cellular dynamics of foot-and-mouth disease virus 3A protein. *PLoS One*, 9, e106685.
- Gonzalez-Magaldi, M., R. Postigo, B. G. de la Torre, Y. A. Vieira, M. Rodriguez-Pulido, E. Lopez-Vinas, P. Gomez-Puertas, D. Andreu, L. Kremer, M. F. Rosas & F. Sobrino (2012) Mutations that hamper dimerization of foot-and-mouth disease virus 3A protein are detrimental for infectivity. *J Virol*, 86, 11013-23.
- Gorbalenya, A. E. & E. V. Koonin (1989) Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res*, 17, 8413-40.
- Goris, N., E. Maradei, R. D'Aloia, N. Fondevila, N. Mattion, A. Perez, E. Smitsart, H. J. Nauwynck, J. La Torre, E. Palma & K. De Clercq (2008) Foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle using homologous and heterologous challenge strains: precision of the "Protection against Podal Generalisation" test. *Vaccine*, 26, 3432-7.
- Gritsun, T. S. & E. A. Gould (1998) Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. *J Virol Methods*, 76, 109-20.
- Gromeier, M., B. Bossert, M. Arita, A. Nomoto & E. Wimmer (1999) Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence. *J Virol*, 73, 958-64.
- Grubman, M. J. & B. Baxt (2004) Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 17, 465-93.
- Grubman, M. J., S. A. Lewis & D. O. Morgan (1993) Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine*, 11, 825-9.
- Guarne, A., J. Tormo, R. Kirchweger, D. Pfistermueller, I. Fita & T. Skern (1998) Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain-like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *EMBO J*, 17, 7469-79.
- Hamblin, C., R. P. Kitching, A. I. Donaldson, J. R. Crowther & I. T. Barnett (1987) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. III. Evaluation of antibodies after infection and vaccination. *Epidemiol Infect*, 99, 733-44.
- Harris, K. S., W. Xiang, L. Alexander, W. S. Lane, A. V. Paul & E. Wimmer (1994) Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding. *J Biol Chem*, 269, 27004-14.
- Hashimoto-Gotoh, T., A. Tsujimura & Y. Ogasahara (1995) Detection of exonuclease activities in restriction endonuclease preparations using an enforcement plasmid for kanamycin-resistance selection. *Gene*, 164, 41-4.
- Haydon, D. T., A. R. Samuel & N. J. Knowles (2001) The generation and persistence of genetic variation in foot-and-mouth disease virus. *Prev Vet Med*, 51, 111-24.
- Heath, L., E. van der Walt, A. Varsani & D. P. Martin (2006) Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J Virol*, 80, 11827-32.
- Herold, J. & R. Andino (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell*, 7, 581-91.
- Higuchi, R., B. Krummel & R. K. Saiki (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 16, 7351-67.
- Hingley, P. J. & T. W. Pay (1987) Sources of variability in foot and mouth disease vaccine potency estimates based on serum neutralizing antibody assay. *J Biol Stand*, 15, 127-42.

- Hogle, J. M., M. Chow & D. J. Filman (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229, 1358-65.
- Hollister, J. R., A. Vagnozzi, N. J. Knowles & E. Rieder (2008) Molecular and phylogenetic analyses of bovine rhinovirus type 2 shows it is closely related to foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 373, 411-25.
- Huang, C. C., M. H. Jong & S. Y. Lin (2000) Characteristics of foot and mouth disease virus in Taiwan. *J Vet Med Sci*, 62, 677-9.
- Jackson, T., S. Clark, S. Berryman, A. Burman, S. Cambier, D. Mu, S. Nishimura & A. M. King (2004) Integrin alphavbeta8 functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the beta-chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol*, 78, 4533-40.
- Jackson, T., F. M. Ellard, R. A. Ghazaleh, S. M. Brookes, W. E. Blakemore, A. H. Corteyn, D. I. Stuart, J. W. Newman & A. M. King (1996) Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 70, 5282-7.
- Jackson, T., A. P. Mould, D. Sheppard & A. M. King (2002) Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 76, 935-41.
- Jackson, T., D. Sheppard, M. Denyer, W. Blakemore & A. M. King (2000) The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 74, 4949-56.
- Kitching, R. P. (1998) A recent history of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol*, 118, 89-108.
- Knipe, T., E. Rieder, B. Baxt, G. Ward & P. W. Mason (1997) Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *J Virol*, 71, 2851-6.
- Knowles, N. J., P. R. Davies, T. Henry, V. O'Donnell, J. M. Pacheco & P. W. Mason (2001) Emergence in Asia of foot-and-mouth disease viruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein. *J Virol*, 75, 1551-6.
- Knowles, N. J. & A. R. Samuel (2003) Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 91, 65-80.
- Knox, C., K. Moffat, S. Ali, M. Ryan & T. Wileman (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.
- Konig, G. A., E. L. Palma, E. Maradei & M. E. Piccone (2007) Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus types A and O isolated in Argentina during the 2000-2002 epizootic. *Vet Microbiol*, 124, 1-15.
- Kuhn, R., N. Luz & E. Beck (1990) Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 64, 4625-31.
- La Torre, J. L., M. J. Grubman, B. Baxt & H. L. Bachrach (1980) The structural polypeptides of aphthovirus are phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 7444-7.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Lea, S., J. Hernandez, W. Blakemore, E. Brocchi, S. Curry, E. Domingo, E. Fry, R. Abu-Ghazaleh, A. King, J. Newman & cols., (1994) The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 2, 123-39.
- Lewis, S. A., D. O. Morgan & M. J. Grubman (1991) Expression, processing, and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J Virol*, 65, 6572-80.

- Li, F., G. F. Browning, M. J. Studdert & B. S. Crabb (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.
- Li, Z., Y. Yi, X. Yin, Z. Zhang & J. Liu (2008) Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PLoS One*, 3, e2273.
- Liang, Q., L. Chen & A. J. Fulco (1995) An efficient and optimized PCR method with high fidelity for site-directed mutagenesis. *PCR Methods Appl*, 4, 269-74.
- Liebermann, H. T., G. Thalmann, T. Bartels & A. Nockler (1993) Experiments on an early protection against foot-and-mouth disease virus. *Acta Virol*, 37, 181-3.
- Lin, J. Y., T. C. Chen, K. F. Weng, S. C. Chang, L. L. Chen & S. R. Shih (2009) Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci*, 16, 103.
- Loeffler, F. 1897. Summarischer Bericht u"ber die Ergebnisse der Untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem., ed. D. M. Wschr., 80-84.
- Lozano, G. & E. Martinez-Salas (2015) Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Curr Opin Virol*, 12, 113-20.
- Lyle, J. M., E. Bullitt, K. Bienz & K. Kirkegaard (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science*, 296, 2218-22.
- Ma, X., P. Li, X. Bai, P. Sun, H. Bao, Z. Lu, Y. Cao, D. Li, Y. Chen, Z. Qiao & Z. Liu (2014) Sequences outside that of residues 93-102 of 3A protein can contribute to the ability of foot-and-mouth disease virus (FMDV) to replicate in bovine-derived cells. *Virus Res*, 191, 161-71.
- Mackay, D. K., M. A. Forsyth, P. R. Davies, A. Berlinzani, G. J. Belsham, M. Flint & M. D. Ryan (1998) Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, 16, 446-59.
- Mahy, B. 2005. *Foot-and Mouth Disease Virus. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- Malirat, V., J. J. de Barros, I. E. Bergmann, M. Campos Rde, E. Neitzert, E. V. da Costa, E. E. da Silva, A. J. Falczuk, D. S. Pinheiro, N. de Vergara, J. L. Cirvera, E. Maradei & R. Di Landro (2007) Phylogenetic analysis of foot-and-mouth disease virus type O re-emerging in free areas of South America. *Virus Res*, 124, 22-8.
- Maradei, E., J. La Torre, B. Robiolo, J. Esteves, C. Seki, A. Pedemonte, M. Iglesias, R. D'Aloia & N. Mattion (2008) Updating of the correlation between IpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphthovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*, 26, 6577-86.
- Maradei, E., V. Malirat, C. P. Beascoechea, E. O. Benitez, A. Pedemonte, C. Seki, S. G. Novo, C. I. Balette, R. D'Aloia, J. L. La Torre, N. Mattion, J. R. Toledo & I. E. Bergmann (2013) Characterization of a type O foot-and-mouth disease virus re-emerging in the year 2011 in free areas of the Southern Cone of South America and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. *Vet Microbiol*, 162, 479-90.
- Maradei, E., C. Perez Beascoechea, V. Malirat, G. Salgado, C. Seki, A. Pedemonte, P. Bonastre, R. D'Aloia, J. L. La Torre, N. Mattion, J. Rodriguez Toledo & I. E. Bergmann (2011) Characterization of foot-and-mouth disease virus from outbreaks in Ecuador during 2009-2010 and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. *Vaccine*, 29, 8230-40.
- Martin-Acebes, M. A., M. Gonzalez-Magaldi, A. Vazquez-Calvo, R. Armas-Portela & F. Sobrino (2009) Internalization of swine vesicular disease virus into cultured

- cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 83, 4216-26.
- Martinez-Salas, E., S. Lopez de Quinto, R. Ramos & O. Fernandez-Miragall (2002) IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie*, 84, 755-63.
- Martinez-Salas, E., J. Ortin & E. Domingo (1985) Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene*, 35, 55-61.
- Martinez-Salas, E., A. Pacheco, P. Serrano & N. Fernandez (2008) New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol*, 89, 611-26.
- Mason, P. W., S. V. Bezborodova & T. M. Henry (2002) Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 76, 9686-94.
- Mason, P. W., M. J. Grubman & B. Baxt (2003) Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res*, 91, 9-32.
- Mason, P. W., M. E. Piccone, T. S. McKenna, J. Chinsangaram & M. J. Grubman (1997) Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology*, 227, 96-102.
- Mateu, M. G., J. L. Da Silva, E. Rocha, D. L. De Brum, A. Alonso, L. Enjuanes, E. Domingo & H. Barahona (1988) Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, 167, 113-24.
- Mattion, N., N. Goris, T. Willems, B. Robiolo, E. Maradei, C. P. Beascochea, A. Perez, E. Smitsaart, N. Fondevila, E. Palma, K. De Clercq & J. La Torre (2009) Some guidelines for determining foot-and-mouth disease vaccine strain matching by serology. *Vaccine*, 27, 741-7.
- Mattion, N., G. Konig, C. Seki, E. Smitsaart, E. Maradei, B. Robiolo, S. Duffy, E. Leon, M. Piccone, A. Sadir, R. Bottini, B. Cosentino, A. Falczuk, R. Maresca, O. Periolo, R. Bellinzoni, A. Espinoza, J. L. Torre & E. L. Palma (2004) Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease. *Vaccine*, 22, 4149-62.
- Mc Cullough K.C., C. J. R., Burcher R.N., Carpenter W.C., Brocchi E., Capucci L. y De Simone F. (1986) Immune protection against foot and mouth disease virus studied using neutralizing and nonneutralizing concentration of monoclonal antibodies. *Inmunology*, 58, 421-428.
- McInerney, G. M., A. M. King, N. Ross-Smith & G. J. Belsham (2000) Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences. *J Gen Virol*, 81, 1699-702.
- Medina, M., E. Domingo, J. K. Brangwyn & G. J. Belsham (1993) The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology*, 194, 355-9.
- Mendez, E., N. Ruggli, M. S. Collett & C. M. Rice (1998) Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J Virol*, 72, 4737-45.
- Moffat, K., G. Howell, C. Knox, G. J. Belsham, P. Monaghan, M. D. Ryan & T. Wileman (2005) Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J Virol*, 79, 4382-95.
- Moffat, K., C. Knox, G. Howell, S. J. Clark, H. Yang, G. J. Belsham, M. Ryan & T. Wileman (2007) Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease

- virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J Virol*, 81, 1129-39.
- Monaghan, P., H. Cook, T. Jackson, M. Ryan & T. Wileman (2004) The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *J Gen Virol*, 85, 933-46.
- Monaghan, P., S. Gold, J. Simpson, Z. Zhang, P. H. Weinreb, S. M. Violette, S. Alexandersen & T. Jackson (2005) The alpha(v)beta6 integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol*, 86, 2769-80.
- Moraes, M. P., F. D. Segundo, C. C. Dias, L. Pena & M. J. Grubman (2011) Increased efficacy of an adenovirus-vectored foot-and-mouth disease capsid subunit vaccine expressing nonstructural protein 2B is associated with a specific T cell response. *Vaccine*, 29, 9431-40.
- Mulcahy, G., C. Gale, P. Robertson, S. Iyisan, R. D. DiMarchi & T. R. Doel (1990) Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 8, 249-56.
- Murray, K. E. & D. J. Barton (2003) Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol*, 77, 4739-50.
- Nayak, A., I. G. Goodfellow & G. J. Belsham (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.
- Nayak, A., I. G. Goodfellow, K. E. Woolaway, J. Birtley, S. Curry & G. J. Belsham (2006) Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol*, 80, 9865-75.
- Newman, J. F., P. G. Piatti, B. M. Gorman, T. G. Burrage, M. D. Ryan, M. Flint & F. Brown (1994) Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 733-7.
- Nieva, J. L., V. Madan & L. Carrasco (2012) Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol*, 10, 563-74.
- Niwa, H., K. Yamamura & J. Miyazaki (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108, 193-9.
- Nomoto, A., B. Detjen, R. Pozzatti & E. Wimmer (1977) The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature*, 268, 208-13.
- Novak, J. E. & K. Kirkegaard (1991) Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol*, 65, 3384-7.
- Núñez, J. I., E. Baranowski, N. Molina, C. M. Ruiz-Jarabo, C. Sanchez, E. Domingo & F. Sobrino (2001) A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol*, 75, 3977-83.
- O'Donnell, V., J. M. Pacheco, M. LaRocco, T. Burrage, W. Jackson, L. L. Rodriguez, M. V. Borca & B. Baxt (2011) Foot-and-mouth disease virus utilizes an autophagic pathway during viral replication. *Virology*, 410, 142-50.
- O'Donnell, V. K., J. M. Pacheco, T. M. Henry & P. W. Mason (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.
- OIE, O. M. d. S. A. 2016. Código Sanitario para los Animales Terrestres

- Pacheco, J. M., D. P. Gladue, L. G. Holinka, J. Arzt, E. Bishop, G. Smoliga, S. J. Pauszek, A. J. Bracht, V. O'Donnell, I. Fernandez-Sainz, P. Fletcher, M. E. Piccone, L. L. Rodriguez & M. V. Borca (2013) A partial deletion in non-structural protein 3A can attenuate foot-and-mouth disease virus in cattle. *Virology*, 446, 260-7.
- Pacheco, J. M., T. M. Henry, V. K. O'Donnell, J. B. Gregory & P. W. Mason (2003) Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 77, 13017-27.
- Pacheco, J. M., K. N. Lee, M. Eschbaumer, E. A. Bishop, E. J. Hartwig, S. J. Pauszek, G. R. Smoliga, S. M. Kim, J. H. Park, Y. J. Ko, H. S. Lee, D. Tark, I. S. Cho, B. Kim, L. L. Rodriguez & J. Arzt (2016) Evaluation of Infectivity, Virulence and Transmission of FDMV Field Strains of Serotypes O and A Isolated In 2010 from Outbreaks in the Republic of Korea. *PLoS One*, 11, e0146445.
- Palmenberg, A. C. (1990) Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol*, 44, 603-23.
- PANAFTOSA-OPS/OMS. 2007. Manual de procedimientos para la atención de ocurrencias de fiebre aftosa y otras enfermedades vesiculares. . Río de Janeiro: Proyecto BID/PANAFTOSA – OPS/OMS para los países del MERCOSUR Ampliado.
- PANAFTOSA (2016) INFORME DE SITUACIÓN de los en SUDAMÉRICA y PANAMÁ en 2015. Programas de Erradicación de la FIEBRE AFTOSA.
- Parsley, T. B., J. S. Towner, L. B. Blyn, E. Ehrenfeld & B. L. Semler (1997) Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA*, 3, 1124-34.
- Paton, D. J., J. F. Valarcher, I. Bergmann, O. G. Matlho, V. M. Zakharov, E. L. Palma & G. R. Thomson (2005) Selection of foot and mouth disease vaccine strains--a review. *Rev Sci Tech*, 24, 981-93.
- Paul, A. V. 2002. Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. In *Molecular Biology of Picornaviruses*, 227-246. Washington, DC: ASM Press.
- Paul, A. V., X. Cao, K. S. Harris, J. Lama & E. Wimmer (1994) Studies with poliovirus polymerase 3Dpol. Stimulation of poly(U) synthesis in vitro by purified poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem*, 269, 29173-81.
- Paul, A. V., J. Peters, J. Mugavero, J. Yin, J. H. van Boom & E. Wimmer (2003) Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol*, 77, 891-904.
- Paul, A. V., E. Rieder, D. W. Kim, J. H. van Boom & E. Wimmer (2000) Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol*, 74, 10359-70.
- Paul, A. V., J. H. van Boom, D. Filippov & E. Wimmer (1998) Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, 393, 280-4.
- Pay, T. W. & P. J. Hingley (1992) Foot and mouth disease vaccine potency tests in cattle: the interrelationship of antigen dose, serum neutralizing antibody response and protection from challenge. *Vaccine*, 10, 699-706.
- Pelletier, J. & N. Sonenberg (1989) Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *J Virol*, 63, 441-4.
- Pereira, H. G. (1976) Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Dev Biol Stand*, 35, 167-74.
- Pereira, H. G. (1981) Foot-and-mouth disease. *Virus Diseases of Food Animals.*, 2, 333-363.
- Periolo, O. H., C. Seki, P. R. Grigera, B. Robiolo, G. Fernandez, E. Maradei, R. D'Aloia & J. L. La Torre (1993) Large-scale use of liquid-phase blocking sandwich

- ELISA for the evaluation of protective immunity against aphthovirus in cattle vaccinated with oil-adjuvanted vaccines in Argentina. *Vaccine*, 11, 754-60.
- Piatti, P. G., A. Berinstein, O. J. Lopez, M. V. Borca, F. Fernandez, A. A. Schudel & A. M. Sadir (1991) Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J Gen Virol*, 72 (Pt 7), 1691-4.
- Piccone, M. E., G. Kaplan, L. Giavedoni, E. Domingo & E. L. Palma (1988) VP1 of serotype C foot-and-mouth disease viruses: long-term conservation of sequences. *J Virol*, 62, 1469-73.
- Polatnick, J. & R. B. Arlinghaus (1967) Foot-and-mouth disease virus-induced ribonucleic acid polymerase in baby hamster kidney cells. *Virology*, 31, 601-8.
- Porter, A. G. (1993) Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol*, 67, 6917-21.
- Porter, A. G., P. Fellner, D. N. Black, D. J. Rowlands, T. J. Harris & F. Brown (1978) 3'-Terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. *Nature*, 276, 298-301.
- Postigo Fernandez, R. 2009. Análisis Funcional de la proteína 3A del Virus de la Fiebre Aftosa. In *Departamento de Biología Molecular*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Racaniello, V. R. 2007. Picornaviridae: The viruses and their replication. . In *Fields Virology*, ed. W. K. L. W. a. Wilkins., 795- 838. Philadelphia.
- Racaniello, V. R. & D. Baltimore (1981) Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 214, 916-9.
- Robiolo, B., P. R. Grigera, O. H. Periolo, C. Seki, T. Bianchi, E. Maradei & J. L. La Torre (1995) Assessment of foot and mouth disease vaccine potency by liquid-phase blocking ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina. *Vaccine*, 13, 1346-52.
- Robiolo, B., J. La Torre, E. Maradei, C. P. Beascochea, A. Perez, C. Seki, E. Smitsaart, N. Fondevila, E. Palma, N. Goris, K. De Clercq & N. Mattion (2010) Confidence in indirect assessment of foot-and-mouth disease vaccine potency and vaccine matching carried out by liquid phase ELISA and virus neutralization tests. *Vaccine*, 28, 6235-41.
- Robiolo, B., C. Seki, N. Fondevilla, P. Grigera, E. Scodeller, O. Periolo, J. La Torre & N. Mattion (2006) Analysis of the immune response to FMDV structural and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests. *Vaccine*, 24, 997-1008.
- Rodriguez, L. L. & M. J. Grubman (2009) Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*, 27 Suppl 4, D90-4.
- Romanutti, C. 2012. Evaluación de la respuesta inmune inducida por distintos inmunógenos recombinantes dirigidos contra el Virus de la Fiebre Aftosa. Universidad de Buenos Aires.
- Romanutti, C., A. D'Antuono, C. Palacios, V. Quattrocchi, P. Zamorano, J. La Torre & N. Mattion (2013) Evaluation of the immune response elicited by vaccination with viral vectors encoding FMDV capsid proteins and boosted with inactivated virus. *Vet Microbiol*, 165, 333-40.
- Rosas, M. F., Y. A. Vieira, R. Postigo, M. A. Martin-Acebes, R. Armas-Portela, E. Martinez-Salas & F. Sobrino (2008) Susceptibility to viral infection is enhanced by stable expression of 3A or 3AB proteins from foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 380, 34-45.
- Rowlands, D. J. 1999. Foot-and-mouth disease virus (Picornaviridae). In *Encyclopedia of Virology*, ed. E. b. A. G. R. G. Webster. London: Academic Press.

- Rowlands, D. J., T. J. Harris & F. Brown (1978) More precise location of the polycytidylic acid tract in foot and mouth disease virus RNA. *J Virol*, 26, 335-43.
- Rueckert, R. 1985. Picornaviruses and their replication. In *Virology Ed. B. Fields*, ed. N. Y. Raven press, 705.
- Rweyemamu, M. M. (1984) Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J Biol Stand*, 12, 323-37.
- Ryan, M. D., Donnelly, M. L. L., Flint, M., Cowton, V. M., Luke, G., Hughes, L. E., Knox, C., y De Felipe, P. . 2004. Foot-and-mouth disease virus proteinases. . In *Foot and mouth disease: Current perspectives*, ed. N. Horizon Bioscience. F. Sobrino, y E. Domingo, Eds.
- Sa-Carvalho, D., E. Rieder, B. Baxt, R. Rodarte, A. Tanuri & P. W. Mason (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.
- Saiz, M., S. Gomez, E. Martinez-Salas & F. Sobrino (2001) Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol*, 82, 93-101.
- Sakamoto, K. & K. Yoshida (2002) Recent outbreaks of foot and mouth disease in countries of east Asia. *Rev Sci Tech*, 21, 459-63.
- Sambrook, J., Fritsch, J. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*.
- Samuel, A. R. & N. J. Knowles (2001) Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry. *Trends Genet*, 17, 421-4.
- Sangar, D. V., D. N. Black, D. J. Rowlands & F. Brown (1977) Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. *J Gen Virol*, 35, 281-97.
- Schudel, A. A., A. M. Sadir, M. E. Etcheverrigaray, S. Samus, O. Colilla & S. Rivenson (1982) Susceptibility of squirrel and Cebus monkeys to foot-and-mouth disease virus. *J Med Primatol*, 11, 126-32.
- Schwoebel, E. D. & M. S. Moore (2000) The control of gene expression by regulated nuclear transport. *Essays Biochem*, 36, 105-13.
- Seki, C., B. Robiolo, O. Periolo, M. Iglesias, A. D'Antuono, E. Maradei, V. Barros, J. La Torre & N. Mattion (2009) Rapid methodology for antigenic profiling of FMDV field strains and for the control of identity, purity and viral integrity in commercial virus vaccines using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol*, 133, 239-51.
- Semler, B. L., C. W. Anderson, R. Hanecak, L. F. Dorner & E. Wimmer (1982) A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell*, 28, 405-12.
- SENASA. 2016. Zonas según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).
- Serrano, P., M. R. Pulido, M. Saiz & E. Martinez-Salas (2006) The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol*, 87, 3013-22.
- Sobrino, F., M. Saiz, M. A. Jimenez-Clavero, J. I. Nuñez, M. F. Rosas, E. Baranowski & V. Ley (2001) Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res*, 32, 1-30.
- Sobrino F., D., E. 2004. *Foot and mouth disease. Current perspectives*.
- Sonenberg, N. & A. G. Hinnebusch (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136, 731-45.
- Steinberger, J. & T. Skern (2014) The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus: structure-function relationships in a proteolytic virulence factor. *Biol Chem*, 395, 1179-85.

- Stoker, M. & I. Macpherson (1964) Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and Its Derivatives. *Nature*, 203, 1355-7.
- Strauss, D. M., L. W. Glustrom & D. S. Wuttke (2003) Towards an understanding of the poliovirus replication complex: the solution structure of the soluble domain of the poliovirus 3A protein. *J Mol Biol*, 330, 225-34.
- Strebel, K. & E. Beck (1986) A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 58, 893-9.
- Strohmaier, K. & K. H. Adam (1976) [Structure of foot-and-mouth disease virus]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 23, 483-506.
- Strohmaier, K., R. Franze & K. H. Adam (1982) Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J Gen Virol*, 59, 295-306.
- Sutmoller, P., S. S. Barteling, R. C. Orlascoaga & K. J. Sumption (2003) Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res*, 91, 101-44.
- Takeda, N., R. J. Kuhn, C. F. Yang, T. Takegami & E. Wimmer (1986) Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J Virol*, 60, 43-53.
- Teterina, N. L., A. E. Gorbalenya, D. Egger, K. Bienz & E. Ehrenfeld (1997) Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol*, 71, 8962-72.
- Teterina, N. L., A. E. Gorbalenya, D. Egger, K. Bienz, M. S. Rinaudo & E. Ehrenfeld (2006) Testing the modularity of the N-terminal amphipathic helix conserved in picornavirus 2C proteins and hepatitis C NS5A protein. *Virology*, 344, 453-67.
- Teterina, N. L., Y. Pinto, J. D. Weaver, K. S. Jensen & E. Ehrenfeld (2011) Analysis of poliovirus protein 3A interactions with viral and cellular proteins in infected cells. *J Virol*, 85, 4284-96.
- Thompson, D., P. Muriel, D. Russell, P. Osborne, A. Bromley, M. Rowland, S. Creigh-Tyte & C. Brown (2002) Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev Sci Tech*, 21, 675-87.
- Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509-44.
- Tulloch, F., U. Pathania, G. A. Luke, J. Nicholson, N. J. Stonehouse, D. J. Rowlands, T. Jackson, T. Tuthill, J. Haas, A. I. Lamond & M. D. Ryan (2014) FMDV replicons encoding green fluorescent protein are replication competent. *J Virol Methods*, 209, 35-40.
- Tully, D. C. & M. A. Fares (2008) The tale of a modern animal plague: tracing the evolutionary history and determining the time-scale for foot and mouth disease virus. *Virology*, 382, 250-6.
- Urban, A., S. Neukirchen & K. E. Jaeger (1997) A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res*, 25, 2227-8.
- Valarcher, J. F., Y. Leforban, M. Rweyemamu, P. L. Roeder, G. Gerbier, D. K. Mackay, K. J. Sumption, D. J. Paton & N. J. Knowles (2008) Incursions of foot-and-mouth disease virus into Europe between 1985 and 2006. *Transbound Emerg Dis*, 55, 14-34.
- van der Werf, S., J. Bradley, E. Wimmer, F. W. Studier & J. J. Dunn (1986) Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 2330-4.
- van Dinten, L. C., J. A. den Boon, A. L. Wassenaar, W. J. Spaan & E. J. Snijder (1997) An infectious arterivirus cDNA clone: identification of a replicase point mutation that abolishes discontinuous mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 991-6.

- Van Maanen, C. & C. Terpstra (1989) Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines. *J Immunol Methods*, 124, 111-9.
- van Ooij, M. J., D. A. Vogt, A. Paul, C. Castro, J. Kuijpers, F. J. van Kuppeveld, C. E. Cameron, E. Wimmer, R. Andino & W. J. Melchers (2006) Structural and functional characterization of the coxsackievirus B3 CRE(2C): role of CRE(2C) in negative- and positive-strand RNA synthesis. *J Gen Virol*, 87, 103-13.
- van Vlijmen, H. W., S. Curry, M. Schaefer & M. Karplus (1998) Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol*, 275, 295-308.
- Vasquez, C., C. D. Denoya, J. L. La Torre & E. L. Palma (1979) Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology*, 97, 195-200.
- Villen, J., E. Borrás, W. M. Schaaper, R. H. Meloen, M. Davila, E. Domingo, E. Giralt & D. Andreu (2002) Functional mimicry of a discontinuous antigenic site by a designed synthetic peptide. *Chembiochem*, 3, 175-82.
- Wang, D., L. Fang, L. Liu, H. Zhong, Q. Chen, R. Luo, X. Liu, Z. Zhang, H. Chen & S. Xiao (2011) Foot-and-mouth disease virus (FMDV) leader proteinase negatively regulates the porcine interferon-lambda1 pathway. *Mol Immunol*, 49, 407-12.
- Wang, D., L. Fang, R. Luo, R. Ye, Y. Fang, L. Xie, H. Chen & S. Xiao (2010) Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 399, 72-8.
- Weissman, C. (1989) Single-strand RNA. *Nature*, 337, 415-6.
- Wessels, E., D. Duijsings, K. H. Lanke, S. H. van Dooren, C. L. Jackson, W. J. Melchers & F. J. van Kuppeveld (2006) Effects of picornavirus 3A Proteins on Protein Transport and GBF1-dependent COP-I recruitment. *J Virol*, 80, 11852-60.
- Wigdorovitz, A. & A. Sadir (1996) [Mechanisms involved in the prolonged humoral immune response: behavior of aphthous fever virus]. *Rev Argent Microbiol*, 28, 45-54.
- Witwer, C., S. Rauscher, I. L. Hofacker & P. F. Stadler (2001) Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res*, 29, 5079-89.
- Xiang, W., A. Cuconati, D. Hope, K. Kirkegaard & E. Wimmer (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.
- Xiang, W., A. Cuconati, A. V. Paul, X. Cao & E. Wimmer (1995) Molecular dissection of the multifunctional poliovirus RNA-binding protein 3AB. *RNA*, 1, 892-904.
- Yantsevich, A. V., A. A. Gilep & S. A. Usanov (2009) Conformational stability of cytochrome b5, enhanced green fluorescent protein, and their fusion protein Hmwb5-EGFP. *Biochemistry (Mosc)*, 74, 518-27.
- Zheng, W., X. Li, J. Wang, X. Li, H. Cao, Y. Wang, Q. Zeng & S. J. Zheng (2014) A critical role of interferon-induced protein IFP35 in the type I interferon response in cells induced by foot-and-mouth disease virus (FMDV) protein 2C. *Arch Virol*, 159, 2925-35.
- Zibert, A., G. Maass, K. Strelbel, M. M. Falk & E. Beck (1990) Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol*, 64, 2467-73.
- Zimmermann, A., B. Nelsen-Salz, J. P. Kruppenbacher & H. J. Eggers (1994) The complete nucleotide sequence and construction of an infectious cDNA clone of a highly virulent encephalomyocarditis virus. *Virology*, 203, 366-72.

