Patogénesis molecular en un modelo experimental de miocarditis

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular

Javier O. Cifuente

Tesis 2009

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido desarrollado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular –IBBM- (CONICET/UNLP) y realizado bajo la dirección del Dr. Ricardo Martín Gómez y la codirección de la Dra. Susan Hafenstein.

A mi viejo y a mi hermano

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a las instituciones públicas que me permitieron formarme gratuitamente, y en su nombre a la sociedad que las sostiene y a los individuos que forman estos organismos públicos, ya que me han permitido este momento; a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, donde me formé como bioquímico y al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, donde desarrollé este trabajo de tesis. También extiendo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por haber sido soporte de estos años de trabajo doctoral.

Agradezco a mi familia, a mi querida viejita (Mónica) y a mi primer maestro, mi viejo (José Horacio). A mis hermanos, Caro, Emi y Julia, por su cariño y ejemplo, y también por su incondicionalidad. Quiero recordar también a mi abuela, mis tíos y primos.

Al soporte de todos los días, mis compañeros de laboratorio, por su soporte y generosidad, por ser mi consulta permanente y haberme enseñado tanto. Gabi, Leti, el Colo, Ricky, Marina y Edu, Noe, Caro y Ale, y a todos los compañeros becarios, tesistas, tesinistas y pasantes del IBBM. Agradezco también a Katita, a Ruben y a Bernabé.

A mis amigos, a los del Sur, a los del Lab, a los de la Facu, a los del CEFCE, a los de la Música; y en especial a aquellos que estuvieron cerca mío en estos años: Julián, Jose y flia, Lucho, Nico C, Roy, Augusto, Nico T, Manolo, Dani y flia, Álvaro y Nati, Christian, Seba, Mica, Carlitos y Melina... y a quienes olvido injustamente en este momento.

A aquellos que son o fueron mis maestros de docencia, a Alberto, Laurita, Laura, Vamba, y en su nombre a todos mis compañeros de docencia.

A los compañeros de extensión, Fernando Pérez y Ángeles Baridón, del laboratorio de virología del Htal. Rossi, por su y por sus enseñanzas.

Al Dr. Victor Romanowski, por su buena disposición a mis consultas, por sus sugerencias, y por haberme permitido trabajar en su laboratorio. A la Dra. Mirta Schattner y a su grupo, por su generosidad y su ayuda. Al Dr. Michael G. Rossmann por haberme permitido realizar parte de mi trabajo en su laboratorio. A Tony, Daniela, Aníbal, Laura y Mario y todos los investigadores que colaboraron desinteresadamente, facilitándome el uso de equipos y a la gente de sus grupos investigación.

Finalmente a las dos personas que sin dudas son las más importantes, ya que sin ellas habría sido imposible arribar a esta instancia. A mi codirectora, la Dra. Susan Hafenstein, por su generosidad y paciencia, por haberme abierto la puerta al mundo de la biología estructural y por confiar en mí. A mi director, el Dr. Ricardo Gómez, por su generosidad a nivel laboral y por su apoyo. Por haberse dedicado a enseñarme desde el principio en horas de mesada codo a codo. Por enseñarme a ser crítico, por las horas de discusiones. A Ricardo también por los buenos momentos extra laborales, por el humor, por sus consejos y su preocupación a nivel personal, por las otras discusiones y las charlas mate o café mediante. Alegría, alegría!

ÍNDICE

Introducción 1
Miocarditis 3
Definición 3
Epidemiología 3
Etiología 3
Patogenia 5
Coxsackievirus B 8
Clasificación 8
Características generales 8
Características estructurales 9
Organización genómica 11
Ciclo de replicación 12
Receptores celulares 14
Estudio del complejo virus receptor por Cryo-EM 15
Determinantes moleculares de patogenicidad de los CVB 17
Estudios previos no publicados 18
Obtención de una variante patogénica de CVB1 a partir de una no patogénica 18
Clonado de CVB1Nm 20

Resultados 23
Estrategia para la caracterización de los determinantes genómicos de patogenicidad del virus CVB1 25

Capítulo 1. Estudios genómicos 27
1.1 Obtención y comparación del genoma de CVB1Nm con CVB1N 27
1.2 Comparación con otros enterovirus y en particular con otros CVBs 28
1.3 Discusión 33

Capítulo 2. Construcción de virus recombinantes 37
2.1 Construcción de nuevos virus recombinantes 37
2.2 Obtención de los virus 40
2.3 Discusión 41

Capítulo 3. Análisis de las regiones genómicas de CVB1Nm responsables del cambio de fenotipo *ex vivo* 43
3.1 Fenotipo en placa sobre células HeLa. 43
3.2 Curva de crecimiento de un paso en células HeLa 44
3.3 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa y RD 44
3.4 Discusión 45

Capítulo 4. Análisis de las regiones genómicas de CVB1Nm responsables del cambio de fenotipo *in vivo* 47
4.1 Replicación viral en páncreas y corazón de ratones C3H/HeJ inoculados con virus recombinantes a los 5 dpi. 47
4.2 Histopatología del páncreas y corazón de ratones C3H/HeJ inoculados con virus recombinantes a los 10 dpi 47
4.3 Discusión 51

Capítulo 5. Análisis de los cambios nucleotídicos de la cápside de CVB1Nm en estructuras tridimensionales 53
5.1 Validación del estudio utilizando la estructura cristalográfica de CVB3 53
5.2 Mapeo de las mutaciones de las variantes intratípicas de CVB1 sobre la estructura de CVB3 56
5.3 Predicción de interacción de mutaciones con el receptor viral usando estructuras virus-receptor obtenidas por Cryo-EM 64
5.4 Discusión. 68

Capítulo 6. Evaluación del papel de los receptores virales en el cambio de fenotipo de CVB1Nm 71
6.1 Ensayo de reducción de placa en células HeLa con receptores virales solubles 71
6.2 Propiedades patogénicas de las variantes parentales en ratones C57BL/6J y C57BL/6J Daf-1 Knock Out. 71
6.3 Hemaglutinación por variantes parentales de eritrocitos humanos y de ratón. 75
6.4 Carga viral en miocardio en ratones WT y KO 75
6.5 Evaluación de la expresión de CAR en corazón de ratones C57BL/6J. 75
6.6 Valoración de la viremia temprana entre ratones C57BL/6J WT y KO 76

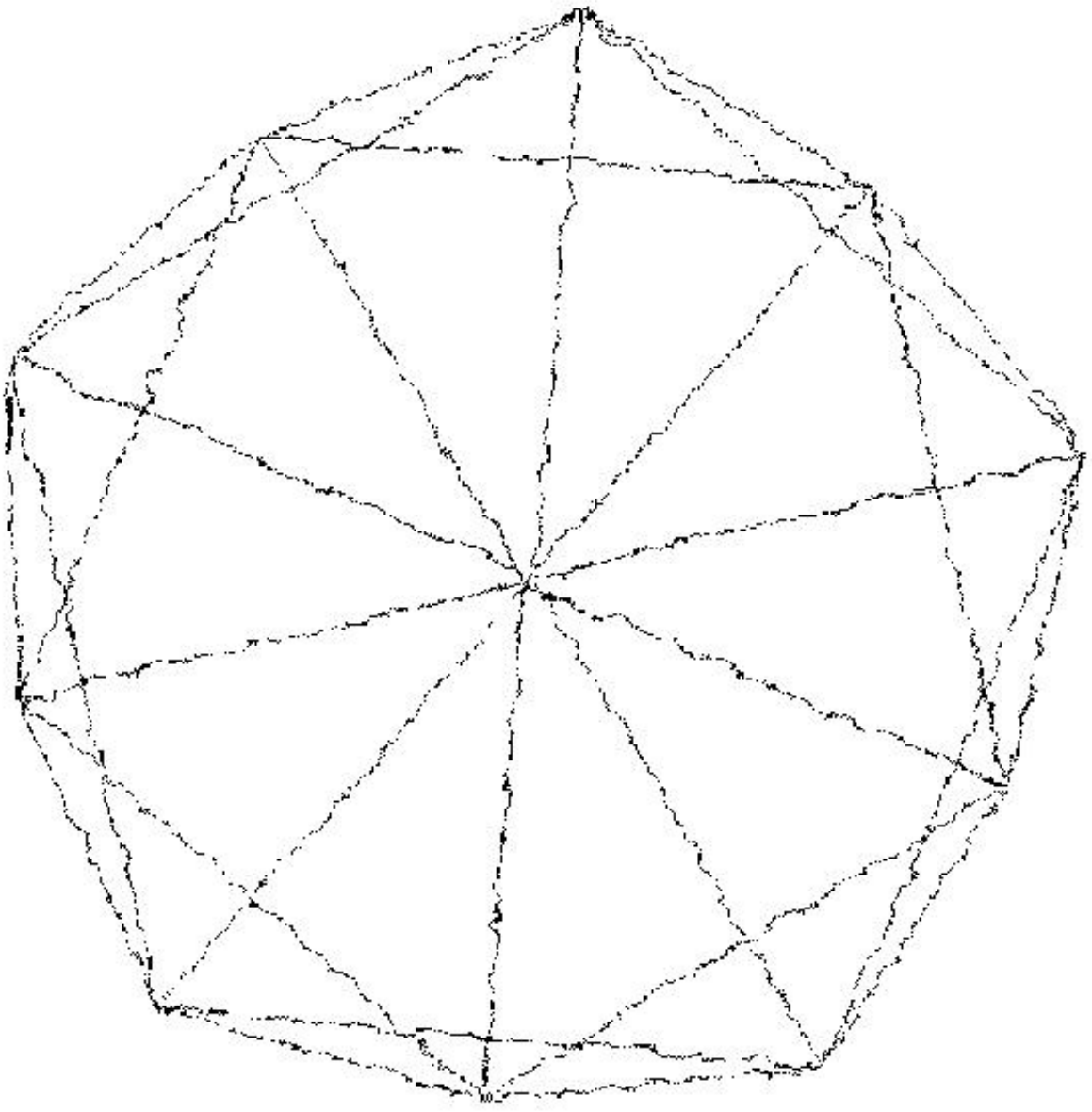
Discusión final, conclusiones y perspectivas 79

Materiales y Métodos 87
Tranfección de ARN viral 89
Virus 89
Ensayo de formación de placas 89
Curva de crecimiento viral de un paso 89
Purificación de virus 90
Ensayo de reducción de placa 90
Ensayo de citotoxicidad 90
Hemaglutinación 90
Animales 91
Infección experimental de ratones 91
Extracción de ARN celular o tisular 91
Retrotranscripción 91
Preparación de bacterias E.coli (DH5) competentes 91
Transformación de bacterias *E. coli* competentes por electroporación. 92
Extracción de DNA plasmídico 92
Digestión enzimática de ADN plasmídico 92
Purificación de ADN a partir de geles de agarosa 92
Obtención de virus recombinantes 93
Secuenciación 93
Trascripción *in vitro* 94
PCR 94
qPCR 94
Electroforesis de ácidos nucleicos 95
Purificación de CAR 95
Técnicas histológicas 96
Score patogénico 96
Análisis *in silico* 96
Alineamientos 96
Uso de modelos 3D cristalográficos y cryo-EM. 97
Análisis estadístico 97

REFERENCIAS 99

Anexos 105

Introducción



Miocarditis

Definición

La miocarditis es un proceso inflamatorio del miocardio en el que se observan células infiltradas asociadas a necrosis y/o degeneración de los miocitos adyacentes (Spotnitz y Lesch 2006); estas lesiones difieren de las típicas del infarto por carecer de la secuencia que caracteriza a la necrosis miocárdica isquémica. Asimismo, el curso evolutivo se discrimina según se trate de una primera biopsia (miocarditis con o sin fibrosis, miocarditis limite, no miocarditis) o de las subsiguientes (miocarditis en curso, en resolución o resuelta) (Aretz, Billingham y col. 1987).
Más recientemente, aunque todavía pendiente su aceptación, se ha propuesto una segunda clasificación que distingue tres formas de cardiomiopatía inflamatoria (es decir, miocarditis asociada a disfunción cardíaca): idiopática, autoinmune e infecciosa, diagnosticadas en base a parámetros histológicos, inmunológicos e inmunohistoquímicos (D'Ambrosio, Patti y col. 2001). Cabe aclarar que la distribución del infiltrado inflamatorio puede ser focal, multifocal o difuso; la naturaleza del infiltrado linfocítica, mixta, eosinofílica o de células gigantes; y la fibrosis perivascular, intersticial, de reemplazo o endocárdica (Aretz, Billingham y col. 1987).

Epidemiología

El hecho de que frecuentemente la miocarditis sea subclínica imposibilita saber cuál es exactamente su historia natural y explica, quizás, porque gran parte del conocimiento epidemiológico proviene de estudios postmortem (Haas 2001). Estos estudios muestran que la miocarditis es una causa mayor (aproximadamente 20%) de muerte súbita e inesperada en adultos, predominantemente varones, y menores de 40 años (Basso, Calabrese y col. 2001). En relación con el agente causal, también se ha sugerido que aproximadamente el 1,5% de las infecciones enterovirales y el 20% de las infecciones chagásicas se evidenciaría por miocarditis. Por otro lado, parecería ser mucho más frecuente en niños que en adultos (Feldman y McNamara 2000).

Etiología

Una gran variedad de infecciones, drogas, toxinas y enfermedades sistémicas autoinmunes pueden asociarse a miocarditis (Kumar, Fausto y col. 2004), aunque en la práctica la causa de la mayoría de los casos observados permanece desconocida ya que se hace difícil establecer una relación fehaciente entre cuadro clínico y diagnóstico etiológico, especialmente cuando los agentes implicados son virus. Si bien en Latinoamérica la etiología chagásica no cabe ser ignorada, son precisamente los virus los agentes causales más frecuentemente involucrados,

particularmente los coxsackie B (CVB) (Gomez y Berria 1988), siendo estos la causa más frecuente de miocarditis en jóvenes y neonatos (Esfandiarei y McManus 2008).

Con el propósito de asociar en forma más precisa al agente etiológico con miocarditis, se ha propuesto utilizar una modificación de los criterios establecidos originalmente por Lerner & Wilson (Perrone y Gomez 2003): 1) alta asociación, con demostración de presencia del agente etiológico en tejidos cardíacos por aislamiento del agente o detección de sus antígenos o detección de su genoma; 2) mediana asociación, con aislamiento o detección de su genoma de fauces/heces u otro tejido y concomitante ascenso de anticuerpos IgG en muestras seriadas de sueros o hallazgo de anticuerpos IgM; y 3) baja asociación, con aislamiento de fauces/heces o ascenso de anticuerpos IgG o evidencia de anticuerpos IgM. En el pasado, los criterios de alta asociación solamente se podían cumplir en forma esporádica ya que, con excepción de los casos pediátricos, es excepcional el aislamiento de virus a partir del tejido miocárdico. La razón podría atribuirse a que los virus más frecuentemente involucrados como agentes etiológicos replican brevemente en el miocardio y por lo tanto resulta excepcional su aislamiento a partir del mismo. Por otro lado, a menos que se trate de brotes epidémicos en casos pediátricos, resultan discutibles aquellos diagnósticos fundamentados en mera recuperación del virus de fauces o heces, porque para los enterovirus el tracto digestivo es precisamente su hábitat bajo condiciones de infección inaparente. En igual forma, la demostración de presencia o ascenso de anticuerpos específicos en suero puede ser debida a una infección subclínica y simultánea a la miocarditis pero sin relación causa-efecto con la misma. Más recientemente, el empleo de técnicas moleculares aplicadas a muestras de biopsias cardíacas ha posibilitado revelar presencia viral por la demostración de sus ácidos nucleicos. Recurriendo a métodos como hibridación *in situ* o PCR (RT-PCR en el caso de virus ARN), se ha logrado detectar presencia de genoma viral en aproximadamente el 50% de los casos estudiados de miocarditis aguda y en un porcentaje menor en el caso de miocarditis crónica o cardiomiopatía dilatada (CMD) (Baboonian, Davies y col. 1997; Rey, Lambert y col. 2001). Es importante resaltar que la mayoría de los estudios mencionados no han incluido secuenciación del ácido nucleico detectado, y por lo tanto no demuestran en forma inequívoca la presencia del agente etiológico involucrado. Asimismo, aunque resultó muy sugestivo que se mostrara evidencia inmunohistoquímica de proteína enteroviral VP1 en tejidos cardíacos de pacientes con miocarditis aguda o CMD, estos hallazgos pueden ser cuestionados ya que la proteína viral llego a detectarse aún en ausencia de genoma viral (Li, Bourlet y col. 2000). La carencia de resultados uniformes y reproducibles con respecto a la presencia de genoma viral en el tejido cardíaco de pacientes con miocarditis crónica y/o CMD, indica que se requieren estudios adicionales bajo condiciones más cuidadosas y estrictas.

Patogenia

La patogenia de la miocarditis puede variar acorde al agente etiológico. En el caso de miocarditis viral, por ser los CVB los más frecuentemente involucrados, serán tomados como modelo. Los CVB, como otros enterovirus, generalmente ingresan al cuerpo por la ruta oral y multiplican inicialmente en la mucosa y submucosa del aparato digestivo. A continuación, ocurre una viremia "menor" con invasión subsiguiente del sistema retículo endotelial. Allí ocurre una replicación viral que puede ser causa de una viremia "mayor" que permitiría al virus alcanzar el tejido cardíaco. Más del 95% de los individuos infectados con enterovirus controlan la infección con anterioridad a la viremia "mayor" desarrollando una infección asintomática, aún cuando la eliminación del virus por materia fecal persista por semanas (Pallansch y Roos 2001).

Los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de la miocarditis son poco conocidos y/o controversiales (Bowles y Towbin 2000), dado que habría evidencias tanto de lisis viral directa como del sistema inmune contribuyendo a la patología (Spotnitz y Lesch 2006). Gran parte del conocimiento actual al respecto se basa en el estudio de modelos experimentales como el de MV murina inducida por CVB3, que produce una MV aguda que puede progresar a CMD en ciertas cepas de ratones susceptibles (Rose, Wolfgram y col. 1986; Esfandiarei y McManus 2008). La infección murina, por inoculación intraperitoneal de CVB, se caracteriza por una replicación viral temprana en páncreas que correlaciona con la viremia, seguida de replicación y necrosis focal de cardiomiocitos con infiltración linfocitaria (Gomez, Lascano y col. 1991) y posterior fibrosis cardíaca (Gomez, Castagnino y col. 1992). El modelo murino de MV inducida por CVB comparte muchos parámetros biológicos de la enfermedad cardíaca aguda y crónica humana y muestra que las alteraciones cardiopatológicas resultan tanto de efectos virales directos (Ej. lisis celular) así como también de reacciones del huésped (Ej. respuesta inmune) en los tejidos cardíacos (Gauntt y Huber 2003)

La importancia de la lisis viral directa tiene sustento en la observación de una extensa replicación viral temprana en el miocardio (Gomez, Lascano y col. 1991; Klingel, Hohenadl y col. 1992) y en la severa MV desarrollada en ratones inmunodeficientes (SCID) inoculados con CVB3 (Chow, Beisel y col. 1992). En este contexto, el receptor celular CAR y el correceptor DAF tendrían un importante papel en la patogénesis temprana de la MV/CMD inducidas por CVB, ya que influirían en el tropismo viral (Selinka, Wolde y col. 2004). Por otra parte, en cepas de ratones que desarrollan MV crónica, se observó persistencia del ARN viral en las células infectadas aún sin la producción de virus infeccioso (Klingel, Hohenadl y col. 1992). Esta persistencia podría desencadenar una respuesta inmune que contribuiría a la enfermedad

(Kandolf, Sauter y col. 1999; Calabrese y Thiene 2003), ya que tanto la respuesta humoral como celular están asociadas con la progresión de la MV hacia la CMD (Furukawa, Kobuke y col. 2001).

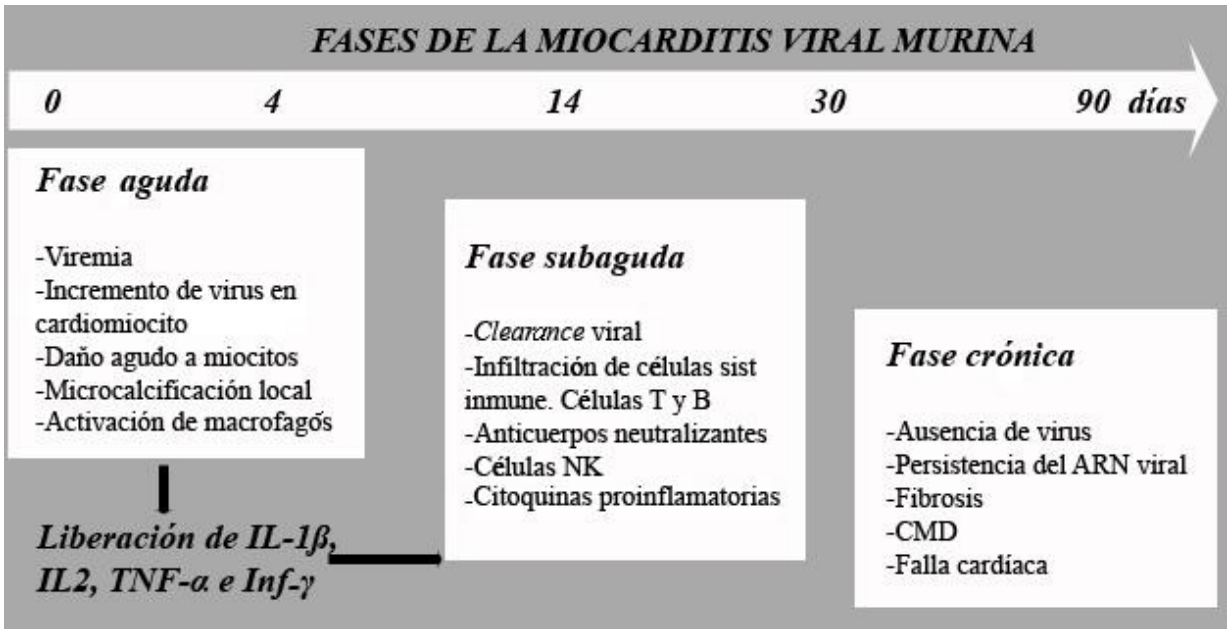


Figura 1. Fases de la miocarditis viral murina. Se resumen los principales eventos en función del tiempo.

Algunos investigadores han involucrado al mimetismo molecular, una situación en la que una respuesta inmune contra antígenos virales reacciona en forma cruzada contra antígenos del tejido cardíaco (tal como ocurre en la fiebre reumática) (Rose y Hill 1996). Se ha observado que en ciertas cepas de ratones la inmunización con miosina cardíaca (pero no de músculo esquelético) induce miocarditis (Pummerer, Luze y col. 1996). Existe alguna evidencia de que anticuerpos monoclonales que neutralizan a CVB reaccionan con el músculo cardíaco, y que la transferencia adoptiva de anticuerpos similares conduce a miocarditis (Gauntt, Arizpe y col. 1995). Por otro lado, en pacientes con miocarditis crónica que presentan anticuerpos séricos contra miosina cardíaca , la disfunción es más severa que en aquellos que carecen de los mismos (Lauer, Schannwell y col. 2000). Utilizando ratones DBA/2 infectados con CVB3, se involucró a un autoanticuerpo IgG reaccionante contra tejido cardíaco, mientras que las células T CD8+ parecieron ser importantes en la patogénesis de miocarditis en ratones BALB/c (Huber, 1997). Asimismo, la depleción de linfocitos T CD8+, célula predominante en el infiltrado miocárdico en ratones BALB/c infectados, condujo a la desaparición de miocitos apoptóticos e indujo la expresión de ARNm de factor natriurético auricular, un marcador de CMD. Las diferencias observadas entre ambas cepas murinas podrían resultar de que los linfocitos Th_1, preferencialmente activados en el caso de ratones BALB/c, podrían colaborar con las células T

citolíticas CD8+, mientras que los linfocitos Th_2, activados preferencialmente cuando se tratara de ratones DBA/2, inducirían citoquinas que a su vez contribuirían a la activación de la célula B (Schwimmbeck, Huber y col. 1997).

En estudios con ratones *knock out* se ha observado que existe un marcado descenso en la mortalidad y en el infiltrado inflamatorio en ratones que carecen de linfocitos T $CD4^+$ como de $CD8^+$, sin que por ello se evidencien cambios en los títulos virales, aunque sí un marcado descenso en los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF) miocárdico (Opavsky, Penninger y col. 1999). En este sentido, reviste particular interés el papel del TNF en la enfermedad miocárdica inflamatoria, ya que dicho factor puede inducir apoptosis en cardiomiocitos y provocar una menor eficiencia contráctil miocárdica *per se*; más aún, se ha observado que ratones transgénicos que sobreexpresan TNF bajo el control de promotores específicamente cardíacos, desarrollan CMD (Kubota, McTiernan y col. 1997). Es evidente que en la fase inicial de la enfermedad hay expresión de otras citoquinas además de TNF, las que entre otros efectos pueden inducir expresión aberrante de moléculas de adhesión y del complejo mayor de histocompatibilidad, así como de sintasas de óxido nítrico (Sharma, Coats y col. 2000). El óxido nítrico tiene un importante efecto depresor sobre el miocardio, y también un efecto inhibitorio sobre la replicación viral; además, puede inducir muerte por apoptosis en los cardiomiocitos (Shimojo, Hiroe y col. 1999). Sin embargo, para algunos autores la apoptosis no parecería representar un mecanismo de importancia en la miocarditis crónica de origen viral o chagásico (Rossi y Souza 1999). En cambio, resultó sorpresivo la comprobación de CMD en ratones transgénicos en que se había introducido bajo el control de promotores cardíacos el genoma mutado del virus CVB3, en forma tal que no pudieran sintetizarse partículas virales infecciosas (Wessely, Klingel y col. 1998), y que por lo tanto simulaban la situación de un corazón humano en que se hubiera detectado presencia de genoma viral en ausencia de virus infeccioso (como en la miocarditis crónica o la CMD). Posteriores estudios *in vitro* demostraron que la proteasa purificada 2A del CVB3, una proteína no estructural, clivaba a la molécula cardíaca distrofina (Badorff y Knowlton 2004), una proteína que se encuentra frecuentemente mutada en las poco frecuentes formas hereditarias de CMD. Más aún, se observó que la infección tisular o en cultivos celulares por CVB3 conducía al clivaje diferencial de distrofina, brindando mayor soporte para un papel de la proteasa 2A en la patogénesis de la miocarditis y de CMD. Sin embargo, el óxido nítrico, que usualmente se encuentra en elevadas concentraciones en la miocarditis y la CMD humana (Fukuchi, Hussain y col. 1998), inhibe el mencionado clivado, resultando incierto, al menos por el momento, el papel patogénico del clivaje de distrofina por la proteasa enteroviral (Badorff, Fichtlscherer y col. 2000).

Más tardíamente, un evento fundamental en la progresión del fallo cardíaco es la remodelación de la matriz extracelular (MEC) (Gomez, Castagnino y col. 1992). Los fibroblastos desempeñan un papel esencial tanto en la síntesis como en la remodelación de la MEC cardíaca, particularmente luego de su diferenciación en miofibroblastos activos (Lijnen, Petrov y col. 2000). Estos cambios en la MEC se han correlacionado con la activación mediada por CTGF (*connective tissue growth factor*) liberado por miocitos infectados y células inflamatorias (Yun, Shin y col. 2007). En este sentido, es interesante destacar que CVB puede replicar en fibroblastos cardíacos sin inducir lisis y en forma persistente pero modificando la síntesis de algunas citoquinas (Heim, Zeuke y col. 2000).

Resumiendo, el fallo cardíaco puede deberse a la acción citotóxica directa del agente infeccioso, a la respuesta inmune generada, a la expresión focal de citoquinas o moléculas como consecuencia de los dos hechos anteriores (Ej. TNF y óxido nítrico), a la inducción de apoptosis y a la remodelación de la MEC. El papel del sistema inmune en la enfermedad inflamatoria miocárdica es sin duda complejo y todavía pobremente entendido. A pesar de la demostración de fenómenos autoinmunes en pacientes con miocarditis y CMD, no hay pruebas concretas de patogénesis autoinmune en estas enfermedades ya sean de origen viral o parasitario.

Coxsackievirus B

Clasificación

Los virus coxsackie (CV) pertenecen a la familia Picornaviridae cuya actual clasificación taxonómica, aceptada en el VIII reporte del comité internacional de taxonomía viral, ICTV 2004 (Stanway 2004), consta de nueve géneros: Aphthovirus, Cardiovirus, Enterovirus, Erbovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Parechovirus, Rhinovirus, Teschovirus y dentro de esta clasificación a los enterovirus, género que incluye las especies poliovirus, los enterovirus humanos (cuatro especies A-D) y los virus entéricos no humanos (Stanway, Brown y col. 2004).

Características generales

Los CV deben su nombre a Coxsackie, ciudad cercana a Nueva York, donde se realizó su primer aislamiento en 1948 por Daldorf y Sickles de las heces de un niño enfermo con parálisis; este aislamiento correspondería luego a los virus tipo A; un año después se aislaría de casos de meningitis aséptica por Melnick y Shaw los de tipo B. Estos CV se hallan incluidos hoy dentro de dos diferentes especies, los enterovirus humanos A y B, dentro de los cuales se hallan los CV A y B, respectivamente. Esta clasificación corresponde al fenotipo que exhiben estos virus durante la infección que desarrollan en ratones lactantes, que resulta en una inflamación y

necrosis difusa en músculo esquelético (CVA) o una miositis focalizada y lesiones degenerativas necróticas en el encéfalo, páncreas, grasa parda y miocardio (CVB). Por último hay que mencionar que los CVB se clasifican a su vez en los serotipos 1 al 6 (Pallansch y Roos 2001).

El género enterovirus comprende un número grande de picornavirus de distribución mundial que utilizan el tracto entérico como el sitio primario de la replicación, y por lo tanto, son estables al pH ácido transmitiéndose por la vía fecal-oral. Aunque la mayoría de las veces producen infecciones asintomáticas, a veces pueden estar asociados a un amplio espectro de enfermedades humanas, incluyendo: meningitis aséptica, mialgia/pleurodinia epidémica (enfermedad de Bornholm), miocarditis/pericarditis, enfermedad generalizada del recién nacido, herpangina, y enfermedad mano, pie, boca (Pallansch y Roos 2001). Con excepción de pancreatitis, raramente producen enfermedad del aparato gastrointestinal (Bruu 2002).

Características estructurales

Como los otros picornavirus, los CVB poseen un diámetro aproximado de 30 nm, una densidad de flotación en CsCl de 1,33-1,34 g/cm^3, su ácido nucleico constituye 29% del peso del virión, son de estructura icosahédrica sin envoltura lipídica y la cápside esta compuesta por 60 subunidades o capsómeros, cada uno de los cuales esta compuesto 4 proteínas estructurales (VP1 a VP4). Dada la simetría icosaédrica de estos virus, sus características estructurales se muestran en base a esta simetría (Figura 2). Brevemente, un icosaedro regular es un poliedro de 20 caras (triángulos equiláteros) y 12 vértices pentagonales, tiene 6 ejes de simetría de orden 5 (*fivefold axis*): rectas que unen los vértices opuestos del sólido; 10 ejes de simetría de orden tres (*threefold axis*): las rectas que unen los baricentros de cada par de caras opuestas; y 15 ejes de simetría de orden 2 (*twofold axis*), rectas que unen los centros de aristas opuestas. Dado esta regularidad se puede definir una subunidad mínima y no simétrica que repetida 60 veces de cómo resultado la estructura completa, la subunidad asimétrica, esta usualmente esta definida y limitada por un eje de simetría 5, dos ejes de orden 3 y uno eje de orden 2 (Baker, Olson y col. 1999).

Las 8 hojas beta que forman cada proteína de la cápside (VP) tejen una estructura de cuña con *loops* (bucles) que las conectan. Estos *loops* adornan la superficie de la partícula y dan la morfología y antigenicidad distintivos de la subunidad. En muchos picornavirus, los sitios antigénicos neutralizantes están situados en los *loops* BC de VP1 y de VP3 y en el *loop* EF de VP2. Estos *loops* pueden acomodar aminoácidos adicionales sin afectar en demasía la cápside (Büchen-Osmond 2006).

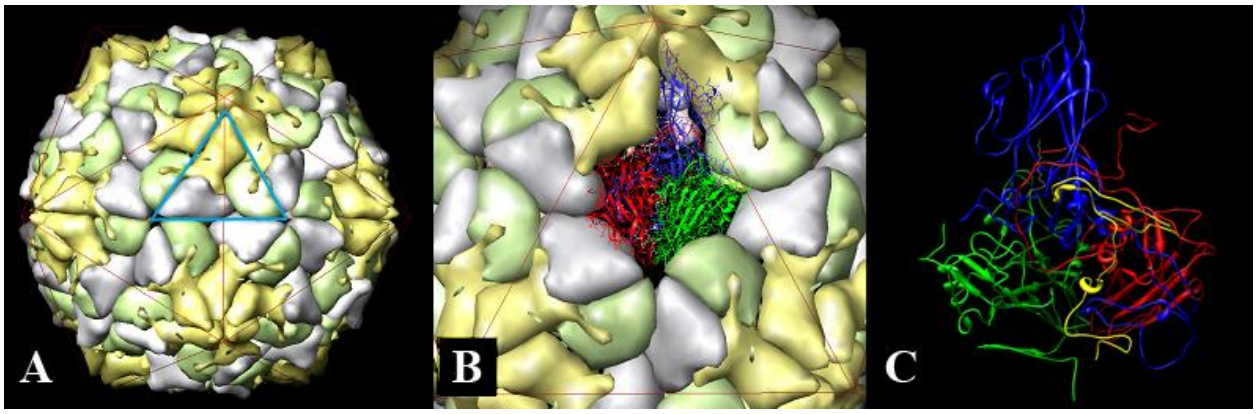


Figura 2. Estructura de la cápside. A: Estructura de la cápside inscripta en un icosaedro regular (líneas rojas) mostrando las VPs sobre la que se resalta la subunidad asimétrica (triángulo celeste) para mostrar su relación espacial en la estructura. B: subunidad estructural (capsómero) vista desde la superficie exterior mostrando el arreglo del encaje de VP1 (azul), VP2 (verde) y VP3 (rojo) en diagrama de cintas. C: diagrama de cintas del protómero visto desde el interior de la cápside, mostrando el arreglo de VP1, VP2, VP3 y VP4 (amarillo). Figuras realizadas en el software Chimera usando como modelo CVB3 (Muckelbauer, Kremer y col. 1995).

En la Figura 3 se observa el modelo obtenido por difracción de rayos X de la estructura viral. Sobre el eje simetría de orden 5 se observa una saliente prominente en forma de estrella en CVB, en comparación con el Poliovirus 1 que es caracterizado por una estructura de meseta en forma de estrella amplia (Figura 3). Asimismo, este eje de simetría esta rodeado de una depresión conocida como "cañón" (en inglés, *canyon*), que es el sitio de unión al receptor CAR (del inglés, *human coxsackievirus and adenovirus receptor*). En el piso, el cañón posee una conexión con una estructura denominada *pocket* (bolsillo), la cual contiene un factor de naturaleza lipídica. Otros motivos importantes en la superficie son las elevaciones conocidas como *puff* y el *beta knob* y una depresión marcada sobre el eje simetría 2 (Muckelbauer, Kremer y col. 1995).

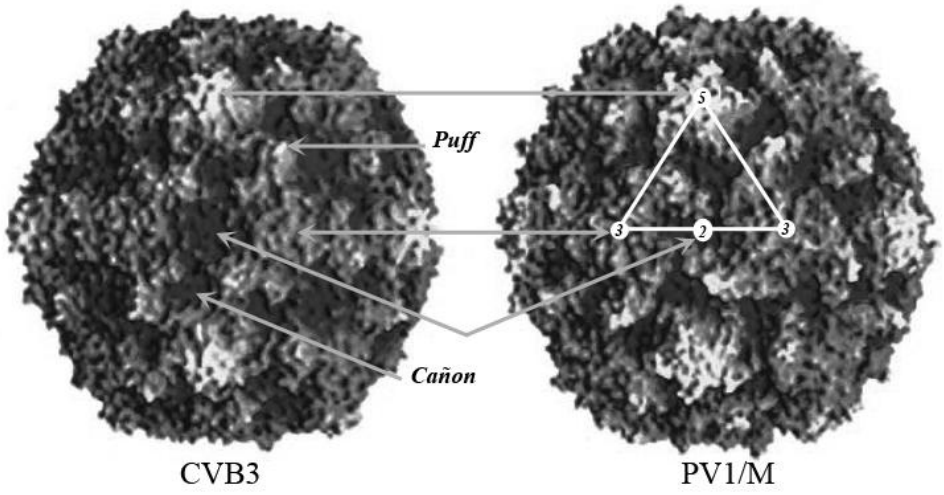


Figura 3. Esquema de la superficie exterior de CVB y su comparación con PV/M (cepa Moloney). Forma de las estructuras de la superficie en escala de grises, correspondiendo a los grises más claros a los máximos de la distancia radial, y en negro a los mínimos de la distancia radial. Se muestra la relación comparada de las estructuras de CVB3 (izquierda) con respecto a PV1 (derecha) donde en esta última, se muestra la subunidad asimétrica (triángulo blanco) y sus ejes de simetría 2, 3 y 5. Se puede apreciar la diferencia en el eje de simetría 5 y la marcada depresión (cañón) en el eje de simetría 2 de CVB (Muckelbauer, Kremer y col. 1995).

Organización genómica

El genoma de los CVB es una molécula de ARN individual de simple cadena y polaridad positiva. El genoma se halla unido por su extremo 5' a una proteína llamada VPg (del inglés, *virion protein genome linked*), la cual esta unida covalentemente por un motivo 5'-uridililato. VPg posee entre 22 y 24 aa, siendo no requerida para la infectividad del ARN, ni su ausencia la reduce. Cabe destacar que esta proteína también se halla en la hebra negativa intermediaria por lo cual se sospecha que podría desempeñar la función de cebador (Racaniello 2001).

El patrón de organización del genoma es común a todos los picornavirus (Figura 4). El genoma posee dos regiones no codificantes. La estructura 5' no traducida ó 5'UTR (del inglés, *untranslated region*), no codificante, larga (742 nucleótidos) y altamente estructurada, con 5 o 6 motivos (bucles y tréboles) que están implicados tanto en la traducción como en la replicación (Gamarnik y Andino 1998; Andino, Boddeker y col. 1999). Esta región controla tanto la replicación, como la traducción del genoma ya que contiene el IRES entre los nucleótidos 432 al 639 (del inglés, *internal ribosomal entry site*), un elemento que dirige la traducción por unión del ribosoma (Schmid y Wimmer 1994). La otra región no codificante 3' ó 3'UTR, es más corta, y posee 3 bucles estructurales y una cola de poliA que si es removida el ARN esencial para el potencial infeccioso, e implicada en el control de la síntesis de ARN (Brown, Cornell y col. 2005).

La región traducida posee un único marco de lectura abierto, ORF (del inglés, *open reading frame*) (Figura 4), que da origen a una poliproteína de 220 kDa que es co o post traduccionalmente clivada de modo autocatalítico y dará origen a 11 proteínas funcionales, y algunas intermediarias, del proceso autoproteolítico. Esta región se haya subdividida según la proteínas a las que da origen. La región P1 codifica las proteínas estructurales de la cápside VP1-4. Las regiones P2 y P3, codifican proteínas no estructurales cuya función es el procesamiento de la poliproteína (2Apro, 3Cpro, 3CDpro) y la replicación del genoma (2B, 2C, 3AB, 3BVPg, 3CDpro, 3D) (Racaniello 2001).

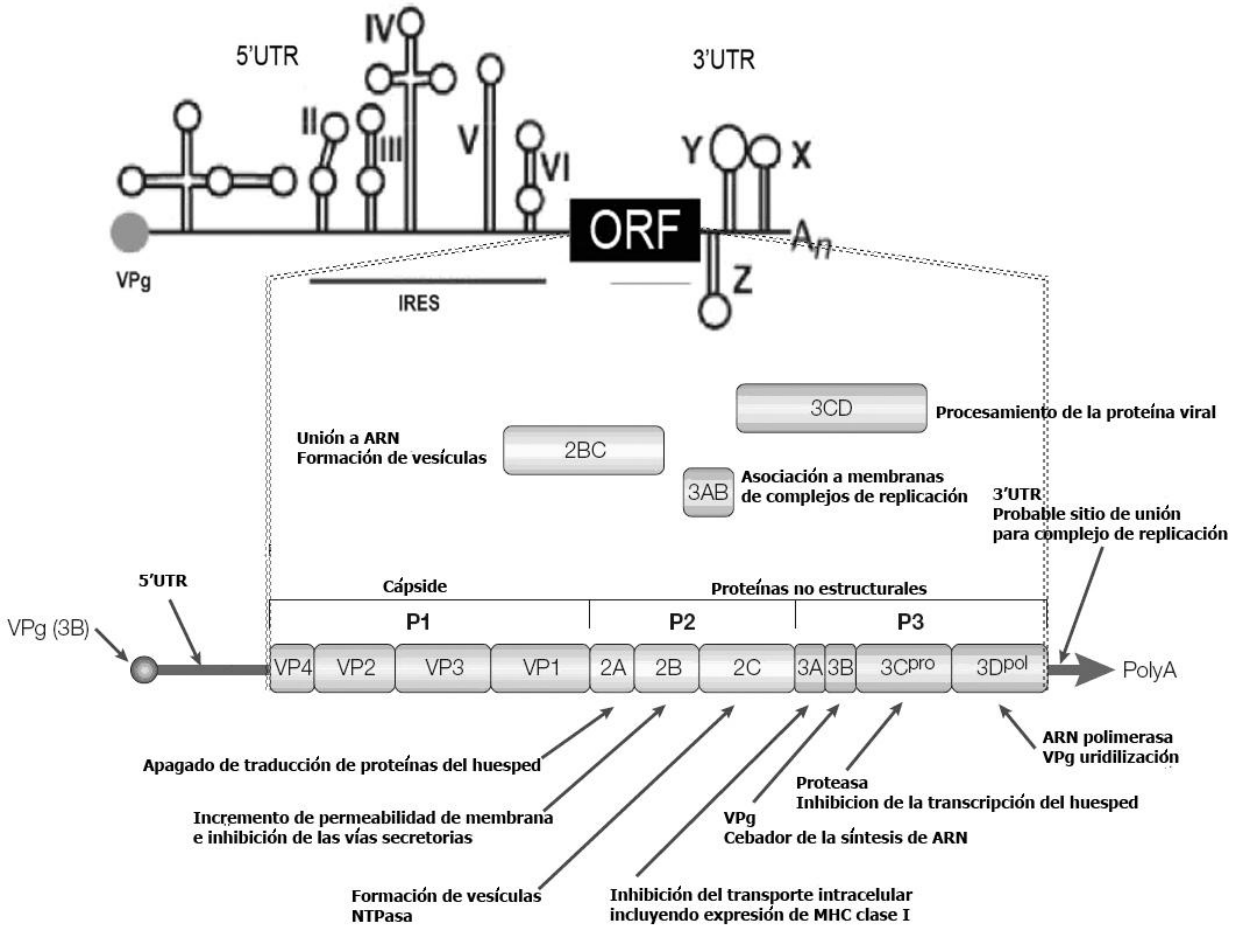


Figura 4. Organización genómica de los CVB. Arriba, el ARN viral donde se destacan las regiones no codificantes y su estructura. Se marca la posición del marco de lectura abierto del genoma viral (el esquema no respeta las proporciones de tamaños de las regiones). Abajo, mapa del ARN viral, y en particular del ORF del genoma de los CV, donde se muestran las regiones codificantes (P1,P2 y P3), el de los productos de clivado de la poliproteína codificada, con sus principales funciones asociadas.

Ciclo de replicación

Varios son los pasos en los que se puede dividir el ciclo de replicación de los CVB, incluyendo a) unión a receptor y/o co-receptores (Bergelson, Mohanty y col. 1995; Bergelson, Cunningham y col. 1997); b) internalización del virus; c) desnudamiento del ARN viral; d) traducción del ARN; e) procesamiento de la poliproteína; f) replicación del ARN viral; g) ensamblaje de las partículas virales; y h) lisis celular y liberación de partículas virales (Racaniello 2001). Estos pasos están esquematizados en la Figura 5.

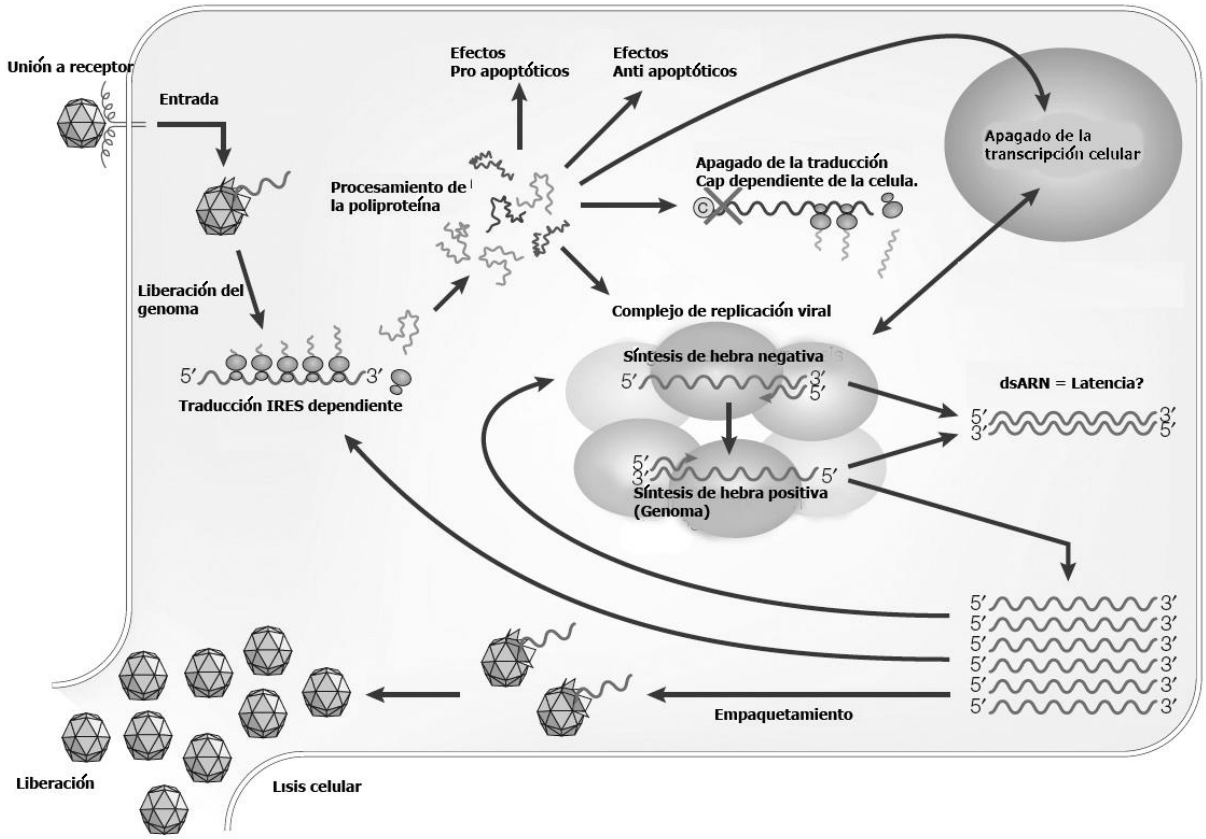


Figura 5. Eventos del ciclo de replicación viral en una célula hospedadora. Principales acontecimientos intracelulares de la replicación viral desde la entrada hasta la liberación de nuevas partículas virales.

Los CVs como cuasiespecies

El mecanismo de evolución y selección genética de los CV esta enmarcado en la teoría de las cuasiespecies. Los virus ARN en general poseen altas tasas de error en la replicación viral y es por esto que poseen una inestabilidad intrínseca en la información genómica y por lo tanto del fenotipo (Domingo, Martin y col. 2006). De esta manera, un determinado genoma de CVB en realidad representa la secuencia consenso de un grupo de genomas de una población sobre la que se ejerce la presión de selección del ambiente, ya que las cuasiespecies virales son distribuciones dinámicas de genomas virales no idénticos pero si relacionados (mutantes o recombinantes) sujetos a continuos procesos de variación genética, competición y selección, que actúan como unidad frente a la selección (Domingo, Martin y col. 2008).

Finalmente, el éxito evolutivo de una población depende de 2 componentes: aquellos de los que depende la supervivencia, y de aquellos de los que depende la generación de progenie viable, y ambos son caracteres del fenotipo, que en conjunto se denomina *fitness* (Domingo, Martin y col. 2006).

Receptores celulares

Es un hecho aceptado que los virus necesitan, en su grán mayoría, de receptores celulares específicos para iniciar la infección de la célula huésped. Estos receptores son los que mayormente explican los tipos celulares susceptibles a la infección y el rango de especies del huésped (Fields 2001). Con respecto a los CVB, se encuentran descriptos dos receptores: CAR (del inglés, *coxsackievirus adenovirus receptor*) (Bergelson, Cunningham y col. 1997) y DAF (del inglés, *decay accelerating factor* o CD-55) (Bergelson, Mohanty y col. 1995; Shafren, Bates y col. 1995).

CAR es una proteína de membrana, de 46 kDa, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que posee 2 dominios extracelulares (D1 y D2), 1 dominio transmembrana y 1 citoplasmático y se halla ampliamente distribuida en diversos tejidos, asociada a las uniones estrechas (*tight juntions*) (Freimuth, Philipson y col. 2008). En particular, en el corazón, se detecta principalmente a nivel de los discos intercalares (Selinka, Wolde y col. 2004) y aunque no esta bien definida su función celular, podría tener un rol de señalización en la célula cardíaca (Lim, Xiong y col. 2008). Además, se ha observado que la expresión de esta molécula en músculo esquelético disminuye con la edad (Nalbantoglu, Pari y col. 1999).

En lo que respecta a CAR como receptor viral, esta proteína es usada por varios adenovirus y por todos los CVB, uniéndose estos a su dominio apical D1, pero de diferente manera (Figura 7). Con respecto a la unión a los CVB, CAR se une a la región del cañón desplazando en teoría al factor alojado en el bolsillo lo que produciría una desestabilización y posible apertura de la cápside (He, Chipman y col. 2001). En este mismo sentido a sido demostrado que la unión a CAR induce la formación de partículas A en contraste con DAF, que no las produce (Freimuth, Philipson y col. 2008). Es de hacer notar que CAR esta altamente conservado entre diversas especies (Freimuth, Philipson y col. 2008).

El otro receptor putativo DAF es una proteína reguladora del complemento anclada a membrana por glicofosfatidilinositol. DAF se halla en la superficie de la mayoría de las células a fin de protegerlas de la activación inespecífica tanto en la vía clásica como de la alternativa del complemento (Miwa, Maldonado y col. 2007). La estructura de DAF esta compuesta por 4 dominios de repeticiones de consenso cortas, SCR (del inglés, *short consensus repeats*), tanto en humano como en roedores (Miwa y Song 2001). Esta molécula es usada como receptor por varios CVB (Shafren, Bates y col. 1995) y también por echovirus (Racaniello 2001) pero se ha demostrado últimamente que en el modo de unirse al receptor difiere (Hafenstein, Bowman y col. 2007).

Estudio del complejo virus receptor por Cryo-EM

En las últimas décadas, los avances en las técnicas de microscopía electrónica (EM) han permitido la investigación de complejos virus-receptor. Por un lado, el desarrollo de la EM a bajas temperaturas (Cryo-EM), ha posibilitado la preservación de estructuras frágiles, que sumado a el desarrollo de algoritmos computacionales efectivos para procesar microfotografías electrónicas, han permitido producir estructuras tridimensionales (3D) con un máximo de resolución de 6 Å (Baker, Olson y col. 1999). Además, el uso complementario de esta técnica con la estructura obtenida por difracción de rayos X permite la reconstrucción estructural de complejos biológicos, que no serian posibles de obtener por cristalización, haciendo posible el estudio de la estructura de complejos compuestos por virus icosaédricos y los receptores celulares permitiendo describir mecanismos moleculares a nivel estructural (Rossmann, FumioArisaka y col. 2007).

En esta técnica, las muestras se hallan en medio acuoso vitrificado a temperatura de etano o propano líquido, mantenido en temperaturas cercanas al punto de congelación del mismo, en un entorno refrigerado por nitrógeno líquido (aprox. -160 Celsius). Las muestras, al no estar teñidas, poseen muy bajo contraste cuando se hallan en foco, por lo que la obtención de imágenes se realiza desenfocando la muestra para obtener un refuerzo en el contraste. Es por esto que, la magnificación, el desenfoque estimado, la dosis de radiación electrónica, así como la función de transferencia y contraste (CTF) del microscopio usado, es información necesaria para la posterior reconstrucción 3D. Una vez tomadas las microfotografías, el esquema de trabajo antes de la reconstrucción incluye la selección y digitalización a alta resolución de las microfotografías, la selección de las imágenes individualizando partículas, y normalizando el brillo/contraste entre ellas, removiendo el ruido, para así luego estimar la resolución. Los siguientes pasos, ya dentro de la reconstrucción computacional propiamente dicha, son obtener las imágenes centradas y estimar la orientación en el espacio de las partículas, para luego corregir ambos parámetros hasta llegar a valores precisos, y combinar la información de un numero grande de imágenes para obtener la estructura 3D (Baker, Olson y col. 1999) imponiéndole geometría icosahédrica asumida (Rossmann, FumioArisaka y col. 2007). Es un procesamiento iterativo en que se va refinando la estructura en el transcurso de los ciclos hasta llegar a la estructura final.

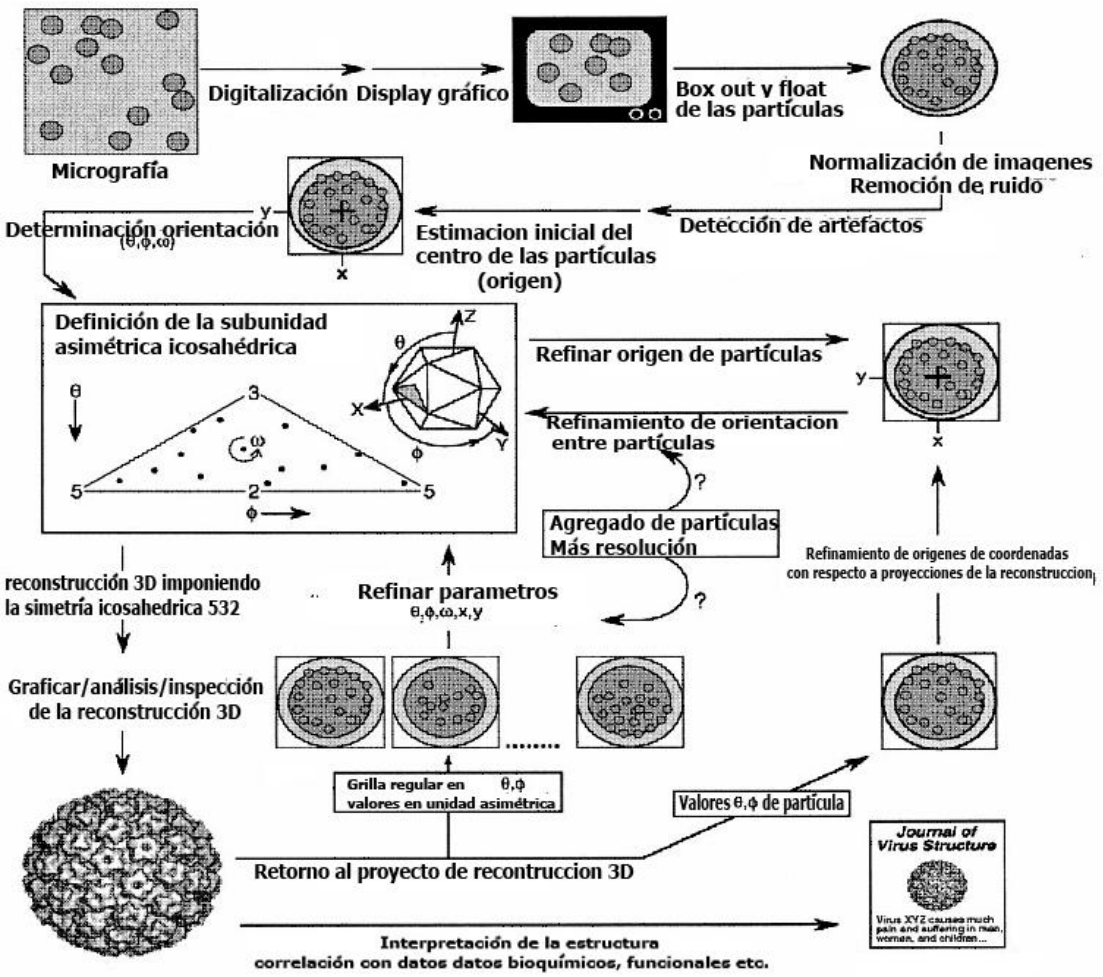


Figura 6. Etapas para obtener una reconstrucción Cryo-EM. Diagrama que resume los pasos a seguir para obtener y validar una reconstrucción Cryo-EM, desde las tomas microfotográficas hasta la obtención de la estructura 3D.

Con el empleo de la Cryo-EM, se han estudiado las interacciones estructurales de los CVB (Muckelbauer, Kremer y col. 1995) con sus receptores, tanto CAR (He, Chipman y col. 2001), como DAF (Hafenstein, Bowman y col. 2007) y, mediante el uso de software, precisar las regiones de unión al receptor tanto en 3D como mapeando sus huellas en diagramas de superficie (roadmaps) (Pettersen, Goddard y col. 2004; Xiao y Rossmann 2006). Con respecto a la unión a CAR (A-B), los CVB emplean, como ya se ha descripto, la región del "cañón", que es una depresión que rodea el eje de simetría pentagonal (Muckelbauer, Kremer y col. 1995), para unirse al dominio apical D1 del ligando CAR. El "cañón" se halla casi centrado en la unidad asimétrica, por lo que en la unión al receptor participan todas las proteínas externas de la cápside (VP1, 2 y 3), de las que se pueden inferir varias interacciones iónicas entre residuos aminoacídicos de CVB y CAR. Se especula que la unión de CAR induce un cambio en el piso del "cañón" que hace que se libere el factor alojado en la estructura hidrofóbica *pocket* (Hafenstein, Bowman y col. 2007). Existe la especulación de que al estar este lugar de unión en el fondo del "cañón", lo hace inaccesible a los anticuerpos, y de esta manera, la generación de

virus mutantes que escapan a los anticuerpos, pueden conservar el sitio de unión a CAR (Rossmann, FumioArisaka y col. 2007).

En el análisis por Cryo-EM, la unión de DAF a los CVB muestra que DAF yace en la superficie, recostándose en forma cruzada a través de la unidad asimétrica, interaccionando con regiones elevadas pero no con el "cañón". Más específicamente, aunque la huella sobre la superficie viral cruza toda la unidad asimétrica, al parecer la afinidad se debe mayoritariamente al SCR2 interaccionando en la región del *puff* (Figura 7 C-D).

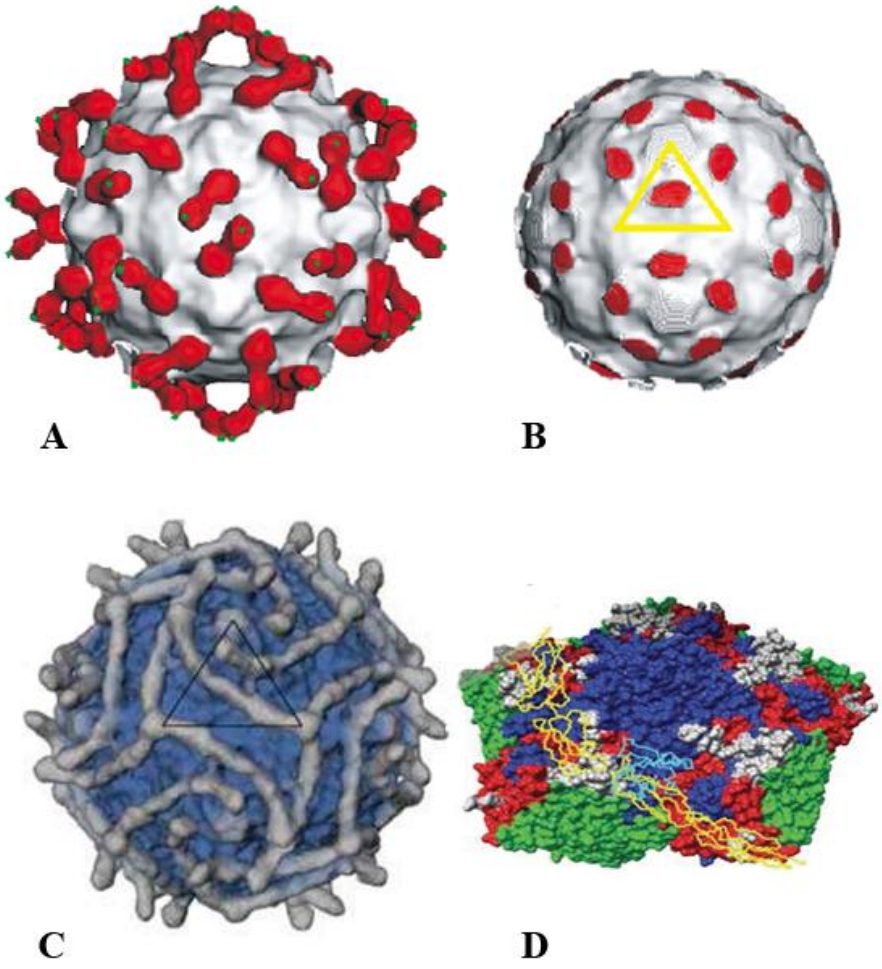


Figura 7. Complejos virus-receptor de CVB elucidados por reconstrucción Cryo-EM. A: reconstrucción del complejo CVB3 (gris)-CAR (rojo) obtenido por Cryo-EM donde se observan los dominios de CAR D1 y D2. B: se observa D1 en el sitio de unión dentro del cañón (la unidad asimétrica se marca como un triangulo en amarillo). C: reconstrucción del complejo CVB3(azul)-DAF(gris) obtenido por Cryo-EM (la unidad asimétrica se marca como un triangulo en negro). D: pentámero en cuya superficie se muestra el esqueleto de Cα de DAF (amarillo).

Determinantes moleculares de patogenicidad de los CVB

Usando variantes del CVB3 desarrolladas en cultivos de tejidos, se ha asociado el nucleótido (nt) 234 de la región 5'UTR: U en el CVB cardiovirulento y C en el avirulento (Tu,

Chapman y col. 1995). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que este nt difícilmente sea un determinante de cardiovirulencia ya que varios aislamientos de CVB3 de pacientes presentan U en la posición 234, independientemente de las diferencias en sus propiedades cardiovirulentas (Gauntt y Pallansch 1996). Por otro lado, se sugiere la existencia de varios determinantes de cardiovirulencia en la región 5' UTR (Dunn, Chapman y col. 2000). En el caso de CVB1, se ha observado que los nts 117 a 161 afectan la virulencia, medida por DL_{50} de ratones recién nacidos (Rinehart, Gomez y col. 1997). Mas recientemente, se ha descripto que los nts 573 y 579 también afectarían la virulencia (Zhong, Li y col. 2008). Otros estudios hallaron que una única mutación en la posición 165 de la proteína de cápside VP2, fue crítica para la cardiovirulencia (Knowlton, Jeon y col. 1996) y que el nt 2916 fue importante para la patogenicidad de CVB3 (Cameron-Wilson, Pandolfino y col. 1998). Es claro que la cardiopatogenicidad puede depender de múltiples determinantes presentes en el genoma. La identificación de estos sitios, el conocimiento de la importancia relativa respecto al fenotipo viral, y la asociación de los mismos con mecanismos patogénicos concretos aguardan más investigaciones sobre el tema.

Estudios previos no publicados

Obtención de una variante patogénica de CVB1 a partir de una no patogénica

Se partió de un clon de ADNc infeccioso de CVB1 (PN14), gentilmente cedido por el Dr. A. Nomoto, Universidad de Tokio (Iizuka, Yonekawa y col. 1991). Luego de obtener virus infeccioso (CVB1N) por trascripción *in vitro* y transfección del ARN resultante en células HeLa, se estudiaron las propiedades patogénicas del virus por inoculación intraperitoneal (ip) en diversas cepas de ratones endocriados jóvenes. Los resultados obtenidos indicaron que CVB1N, independientemente de la dosis utilizada, induce muy poca, si alguna, patología en corazón y páncreas (

Figura 9), que son los tejidos más frecuentemente afectados en ratones de este grupo etario. A fin de obtener una variante más patogénica, se inocularon varios ratones inmunodeficientes (SCID) con CVB1N y 8 semanas posinoculación (pi), se realizaron aislamientos virales del corazón de estos animales. Se identificó una variante (denominada CVB1Nm) que poseía un fenotipo distinto en ensayos de placa de células HeLa (Figura 8).

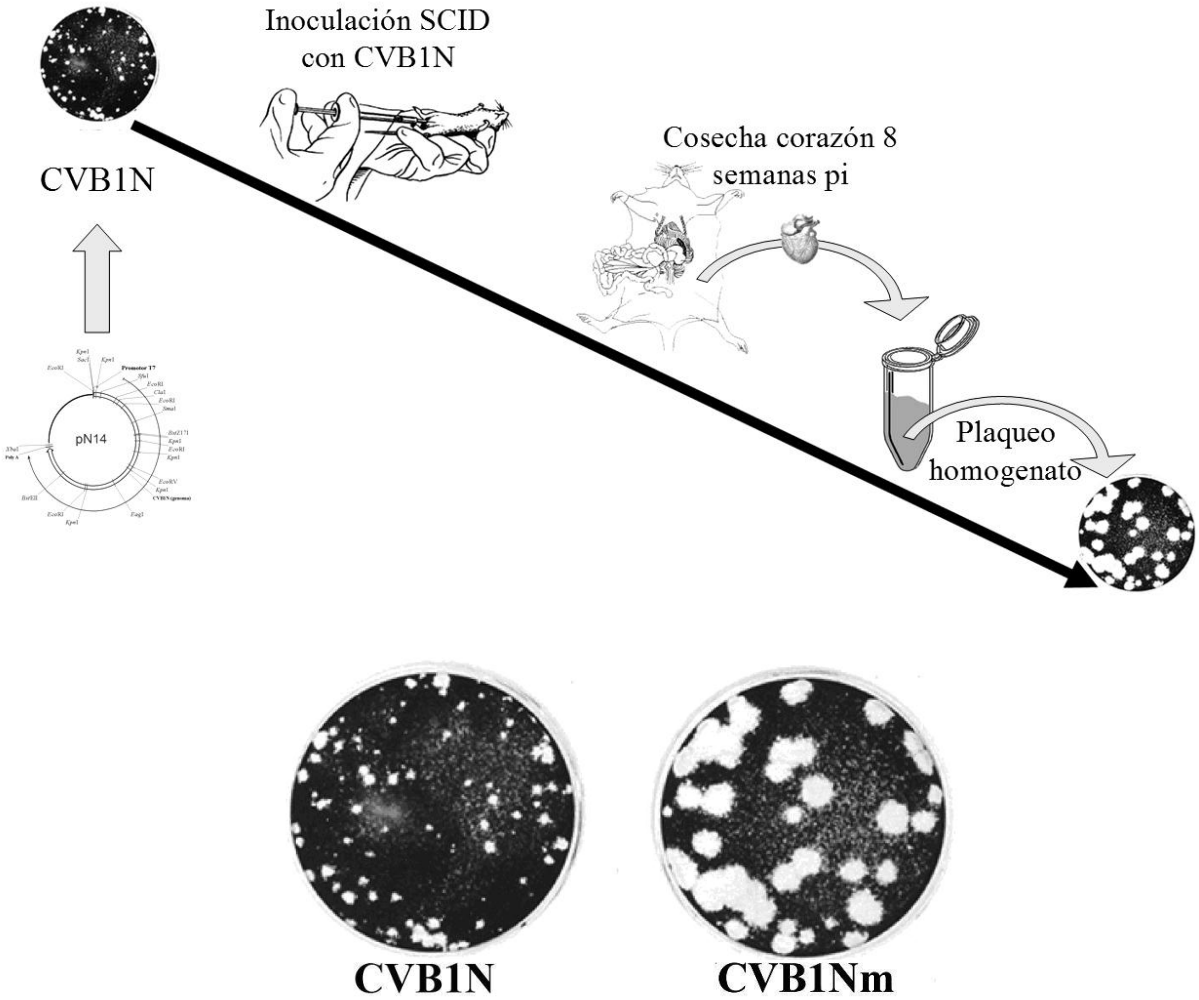


Figura 8. Arriba, esquema que resume la obtención de la nueva variante CVB1Nm. Abajo, detalle de las diferencias en el fenotipo de CVB1N y CVB1Nm en el ensayo de placas sobre células Hela

Esta variante fue posteriormente inoculada en ratones inmunocompetentes a fin de verificar su patogenicidad, observándose que inducía pancreatitis y miocarditis agudas (

Figura 9) con relativa baja mortalidad (20%) en ratones jóvenes (3 semanas de edad) C3H/HeJ. A los 5 días pi, se detectaron aproximadamente 10^7 UFP/g (unidades formadoras de placas de virus por gramo de tejido) en el páncreas y el corazón de ratones inoculados con CVB1Nm, en contraste con los menos de ~10^2 UFP/g registrados con CVB1N en ambos órganos.

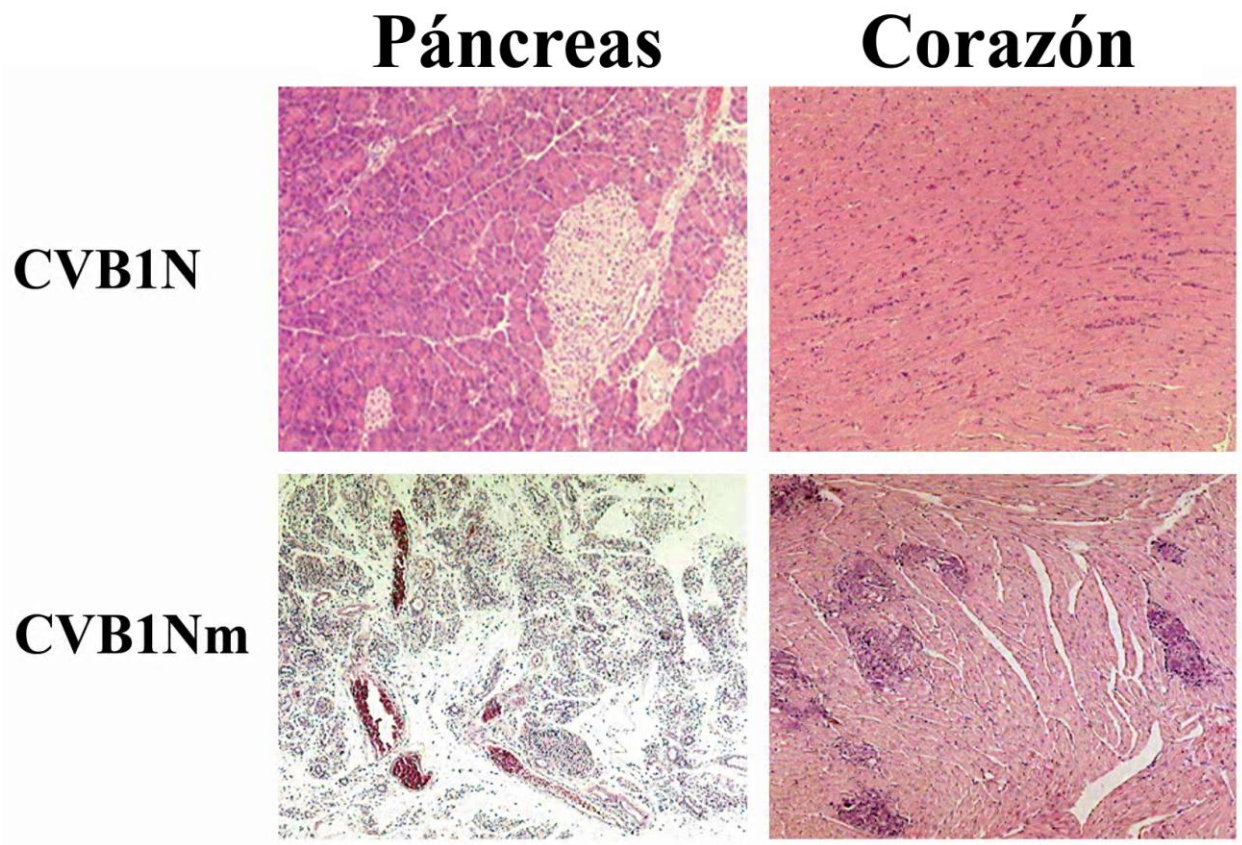


Figura 9. Histopatología a los 10 dpi de ratones C3H/HeJ infectados a los 21 días de edad. Mientras los cortes provenientes de animales inoculados con CVB1N son normales, los provenientes de los inoculados con CVB1Nm muestran pancreatitis acinar severa y miocarditis multifocal. Se muestran secciones representativas hematoxilina y eosina (fotografia a 250X).

Clonado de CVB1Nm

La variante viral CVB1Nm fue purificada por aislamiento de placas por dos veces consecutivas. A partir del segundo aislamiento por placa se produjo un stock viral a partir del cual se purificaron viriones y se aisló el ARN. Utilizando un panel de *primers* seleccionados se amplificaron mediante RT-PCR regiones del genoma parcialmente superpuestas, que comprenden los nts 1-3448, 1-6550 y 4916-polyA. Estos fragmentos de ADNc fueron clonados en pGEM-T (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego por diversos cortes y empalmes con enzimas de restricción, regiones genómicas virales de CVB1Nm fueron agregadas dentro del esqueleto del clon de CVB1 (PN14) para obtener clones quimericos, como se indica en la Figura 10. Brevemente el plásmido pGEMT (1-3448) fue digerido secuencialmente usando *ClaI, KpnI* y *EcoRI.* Los fragmentos de interés se purificaron de a uno y se ligaron en un intento para la obtención de pC69-805 (Figura 10). A esta construcción inicial C69-805 se le reemplazo la región entre los nts. 251-6365, con la región equivalente de CVB1Nm clonada en el pGEM 1-6550, usando para ello con enzimas de restricción con único sitio de corte dentro del genoma (*SfuI-BstEII*).

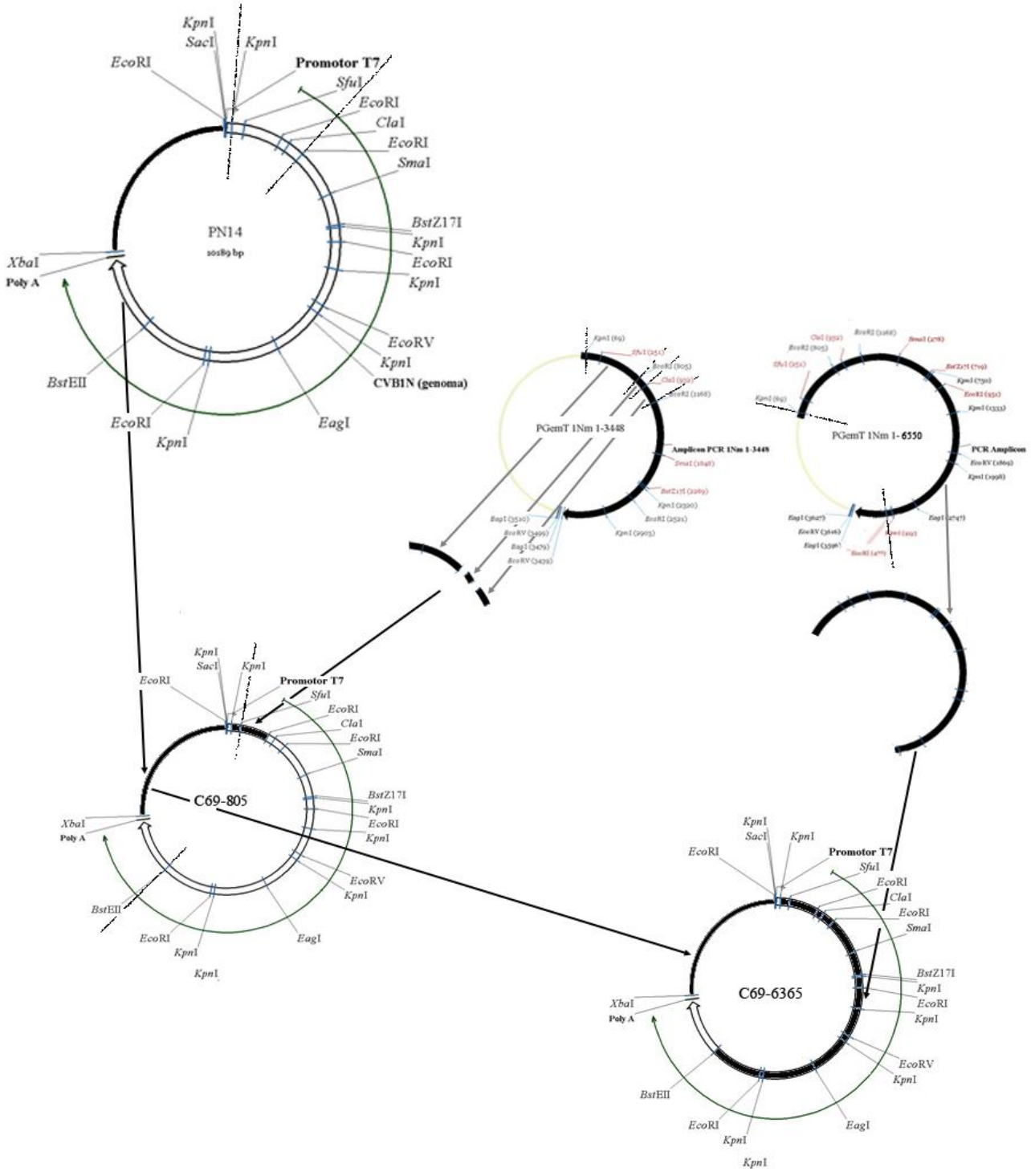
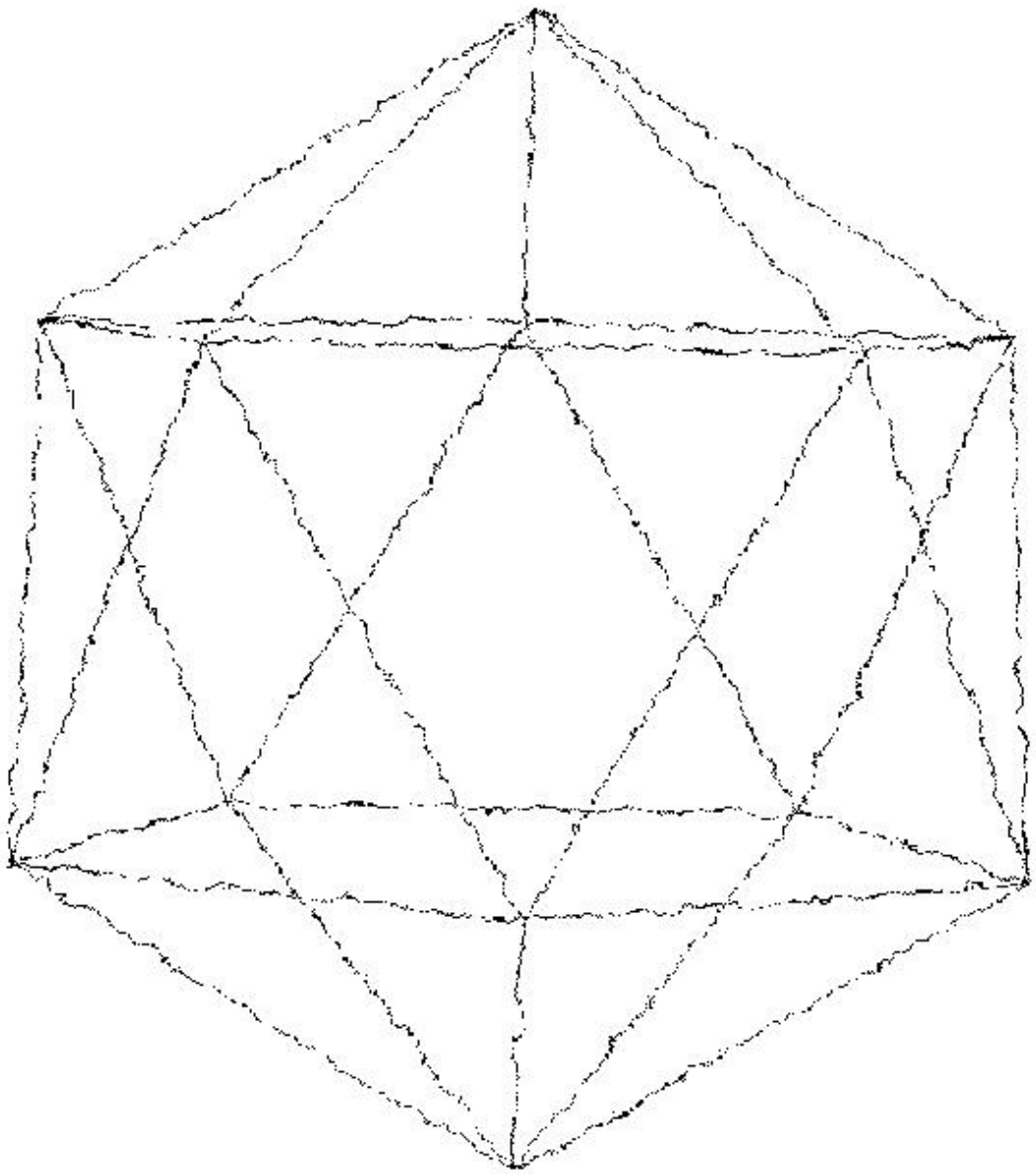


Figura 10. Esquemas del clon infeccioso PN14, de los plásmidos obtenidos del clonado de fragmentos de CVB1Nm en pGEMT, y de los dos clones obtenidos, pC69-805 y pC69-6365. El diagrama de flechas muestra los fragmentos de los que se obtuvo primero pC69-805 y a partir de este pC69-6365.

Resultados



Estrategia para la caracterización de los determinantes genómicos de patogenicidad del virus CVB1

Como estrategia inicial a fin de descubrir que mecanismos moleculares están involucrados en el cambio de un virus Coxsackie B no miocardítico a uno miocardítico, se tomó como modelo de estudio el serotipo CVB1. De las distintas cepas de CVB1, se escogió una variante que era la única que contaba con un clon infeccioso y secuencia conocida en ese momento. Con dicho clon infeccioso, se procedió a la obtención de virus infeccioso y a la caracterización del fenotipo correspondiente, tal como se detalló en la Introducción. El virus CVB1, clonado en el laboratorio del Dr. Nomoto, y denominado aquí CVB1N, induce muy poca patología tanto en páncreas como en corazón luego de su inoculación en ratones de 21 días. Por lo tanto, lo que se precisaba ahora era un virus que fuera significativamente más patogénico en dichos órganos y no fuera muy distinto. Un aislamiento clínico tendría demasiada diversidad en su secuencia nucleotídica aún cuando fuera un serotipo CVB1 ya que la tasa de mutación de los virus ARN suele ser de 1 cada 100 a 1000 nucleótidos copiados. La aproximación que se utilizó fue realizar una inoculación en ratones SCID con CVB1N y luego seleccionar aislamientos de placas con distintos fenotipos para verificar su patogenicidad en ratones normales. De esta forma se obtuvo la variante CVB1Nm, que era significativamente más patogénica. Posteriormente, el virus fue purificado y 3 segmentos del ADNc resultante de la RT-PCR fueron clonados en vectores pGEMT.

Habiéndose obtenido una variante con distintas propiedades patogénicas, derivada de la anterior, y estando la misma clonada en su totalidad, podían iniciarse entonces los estudios necesarios para conocer su secuencia nucleotídica y para revelar que segmentos de ese genoma eran los responsables de los cambios en el fenotipo observado.

Los objetivos particulares del presente trabajo se centran en la identificación de las regiones del genoma del CVB1 donde se produjeron cambios genómicos entre estas variantes intratípicas, la generación de virus recombinantes entre dichas variantes, el estudio replicativo *ex vivo* e *in vivo* de los virus con el objeto del evidenciar regiones responsables del cambio de fenotipo y la búsqueda de determinantes de patogenicidad en dichas regiones. También se efectuara un análisis estructural de la cápside viral usando estructuras ya elucidadas de virus altamente relacionados para evaluar posibles mecanismos involucrados en estos cambios y se estudiará el rol de los receptores virales a tal fin.

Capítulo 1. Estudios genómicos

Consecutivo a la clonación del genoma de CVB1Nm, se procedió a la secuenciación del mismo para conocer la secuencia nucleotídica completa del genoma de CVB1Nm, a fin de comenzar a elucidar que mutaciones pudiesen estar implicadas en el cambio del fenotipo con respecto CVB1N, y por ende de los mecanismos que podrían estar involucrados. La obtención de la secuencia también permitió poder análisis por alineamiento con secuencias de otros enterovirus ya conocidas, y en particular de otros CVB, con el fin de realizar estudios comparativos. A continuación se presentan los resultados obtenidos y el análisis de los mismos.

1.1 Obtención y comparación del genoma de CVB1Nm con CVB1N

La secuencia completa de CVB1Nm fue determinada utilizando diversos primers (detallados en Materiales y Métodos) a partir de los clones originales pGEMT 1-3448, pGEMT 1-6550 y pGEMT 4916-PoliT. Los cambios nucleotídicos observados fueron todos confirmados en la cadena complementaria y en la secuenciación de pC69-6365 a fin de descartar artefactos propios de la polimerasa empleada en la reacción de secuenciación. Una vez obtenidas todas las secuencias, las mismas fueron ensambladas y comparadas con la secuencia de CVB1N. Se observaron 23 cambios de nucleótidos entre ambas variantes representando una diferencia de 0. 3% respecto del genoma de CVB1N.

El análisis de estas mutaciones revela 12 cambios en la secuencia de aminoácidos de la poliproteína, de los cuales 1 es debido a la inserción de un codón, 5 son mutaciones silenciosas en la región que codifica la poliproteína viral y 5 son mutaciones en la región 5'UTR. De particular interés son las 2 mutaciones ubicadas en el *stem loop* II de la región 5'UTR, 8 de la región P1 que codifica para la cápside viral y 3 de la región que codifica la polimerasa viral (Tabla 1).

Tabla 1. Diferencia en la secuencia genómica entre CVB1N y CVB1Nm. Se muestra en forma resumida las diferencias nucleotídicas y las aminoacídicas predichas entre CVB1N y CVB1Nm.

Región genómica Viral	nt[a]	Diferencias nucleotídicas		Cambios aminoacídicos [b]
		CVB1N	CVB1Nm	
5' UTR	35	-	G	
5' UTR	118	U	C	
5' UTR	133	U	A	
5' UTR	184	C	-	
5' UTR	606	A	G	
VP4	888	C	U	
VP4	919	A	G	I→V, 60
VP2	1443	U	A	D→E, 165
VP3	1836	G	A	
VP3	1916	A	C	N→T, 60
VP3	1972	A	G	R→G, 79
VP1	2690	A	C	N→T, 80
VP1	2770	-	CUG	L, 107
VP1	2824	G	C	E→Q, 125
VP1	2850	C	U	
VP1	2914	A	G	T→A, 155
VP1	3272	A	G	N→S, 274
2B	3816	U	C	
2B	3873	A	G	
3D	6133	G	A	V→I, 78
3D	6953	G	A	C→Y, 351
3D	7231	GC	CG	A→R, 444

(a) Posiciones nucleotídicas referidas a CVB1N. (b) Cambios para la proteína viral madura.

1.2 Comparación con otros enterovirus y en particular con otros CVBs

Del análisis de la secuencia entre CVB1N y 1Nm se intentó, en el caso del 5'UTR, elucidar la frecuencia de aparición de los nucleótidos de interés; en el resto, los cambios aminoacídicos en la poliproteína a partir de alineamientos y búsqueda en bibliotecas genómicas de acceso público (NCBI). Luego se realizó el cálculo de la entropía de Shannon (H(X)) para los alineamientos de la poliproteína como *score* indicador de la conservación de residuos en las posiciones de interés.

Para analizar la 5'UTR, se submitió la secuencia subgenómica completa de esta región y utilizando la interfaz Blastn (NCBI), restringiendo la búsqueda a *Human enterovirus B* (taxid:138949), de la cual se obtuvieron 100 secuencias alineadas contra las que se compararon las mutaciones, con excepción al nt 35, en la que se halló un número menor. En todas las posiciones se encontraron secuencias correspondientes a todos los serotipos pertenecientes a CVB, además de enterovirus B y echovirus altamente relacionados.

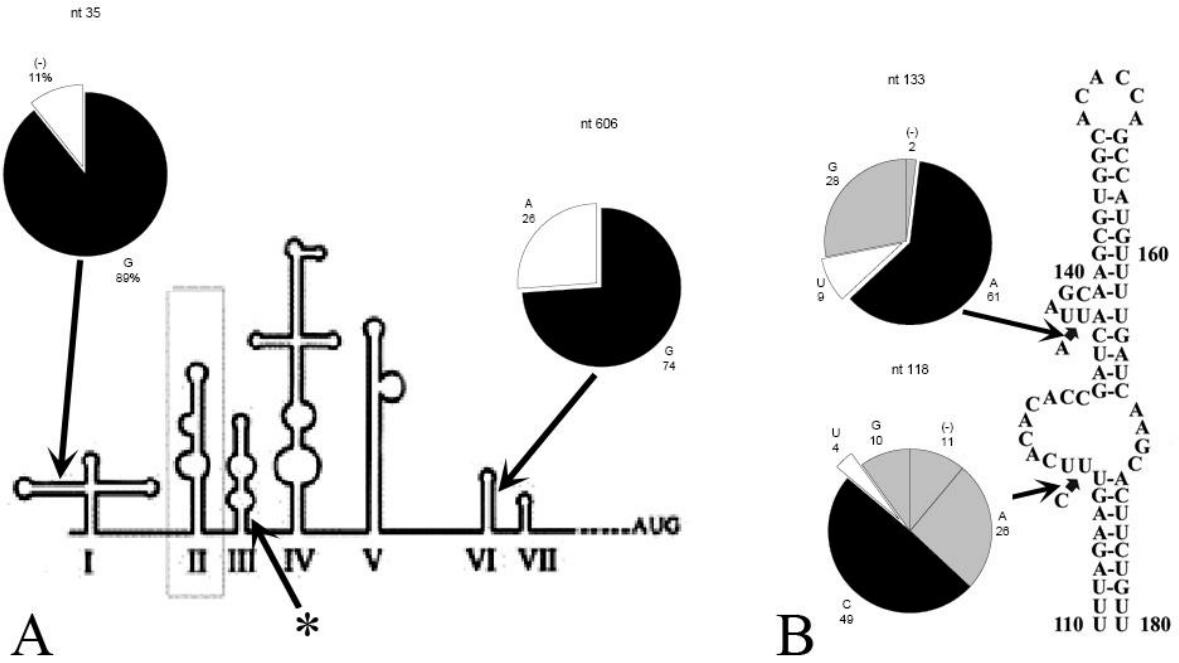


Figura 11. A: representación de la estructura secundaria aceptada de la región 5'UTR del genoma de los CVBs, con la ubicación de las mutaciones en los nucleótidos nt 35 y nt 606, y la deleción en el nt 184 en CVB1Nm (asterisco). B: cambios nucleotídicos entre CVB1N y 1Nm en el *stem loop* II. Los gráficos de áreas circulares muestran la frecuencia de aparición, en alineamientos con otros enterovirus, de los nucleótidos especificados en esas posiciones, correspondiendo al negro para CVB1Nm, blanco para 1N y gris para otros enterovirus.

En el nt 35, cuya posición putativa corresponde al plegamiento secundario I *cloverleaf*, la inserción de G, en CVB1Nm, es mayoritaria. En el caso de los nucleótidos 118 y 133 en el *stem loop* II, los nts correspondientes al mutante (C y A, respectivamente) son mayoritarios frente a las demás bases nucleotídicas encontradas. En contraste, los correspondientes a CVB1N (U en ambas posiciones) son minoritarios. La deleción compensatoria de C en el nt 184 de CVB1Nm no pudo ser encontrada en las bases de datos, donde aparecen muy conservadas entre los nt 181-184 cuatro citocinas. Finalmente, en el nt 606, se hallaron la G correspondiente a 1Nm y la A presente en CVB1N, esta última con una frecuencia algo menor. Un resumen de estos resultados se muestra en la Figura 11.

También se realizaron alineamientos con la secuencia aminoacídica codificada por la región P utilizando la base de datos del NCBI, a fin de buscar la frecuencia de aparición de los

restos aminoacídicos correspondiente a 1N y a 1Nm. La estrategia para ello fue utilizar secuencias de 21 aa de forma que el residuo aminoacídico de interés estubiese centrado por 10 aa flanqueantes. Se alinearon usando el modo "*best suite*" del algoritmo Blastp (*protein-protein* Blast), restringiendo la búsqueda a *human enterovirus B* (taxid:138949). En esta búsqueda, limitada a 100 secuencias, se encontraron todos los serotipos pertenecientes a coxsackievirus B, además de enterovirus B y echovirus altamente relacionados y se alinearon dichas secuencias aminoacídicas usando la interfaz Cobalt (NCBI). Luego, se realizó el cálculo de HN(X) normalizada con respecto a la matriz de alineamienos, y de Hn(X) normalizada para cada columna del alineamiento como se indica en Materiales y Métodos.

Se observó que de los residuos correspondientes a las posiciones VP1 80, VP1 107, VP1 125 y VP3 79, los aa propios a CVB1Nm (T, L, Q y G, respectivamente) son más frecuentes en dichas posiciones, en comparación con los de 1N (N, una deleción (-), E y R) (ver Tabla 2). Lo contrario fue observado para la posición VP1 155 y VP4 60, donde los residuos correspondientes a CVB1Nm (A y V, respectivamente) son minoritarios respecto de sus contrapartes en CVB1N (T y I). En las posiciones VP1 274, VP2 165 y VP3 60, los residuos aminoacídicos de 1N y 1Nm se hallan con una frecuencia similar, aunque cabe resaltar que las posiciones VP2 165 y VP3 60 poseen alta variabilidad, como lo refleja HN(X).

Residuo	Frecuencia				Hn(X)
	CVB1N		CVB1Nm		
VP4 60	I	0,98	V	0,02	0,14
VP2 165	D	0,06	E	0,07	0,81
VP3 60	N	0,05	T	0,10	0,75
VP3 79	R	0,02	G	0,85	0,44
VP1 80	N	0,06	T	0,41	0,67
VP1 107	-	0,03	L	0,34	0,61
VP1 125	E	0,05	Q	0,38	0,76
VP1 155	T	0,02	A	0,25	0,73
VP1 274	N	0,40	S	0,33	0,8
3D 78	V	0.98	I	0,02	
3D 351	C	0,01	Y	0.99	
3D 444	A	0,01	R	0.99	

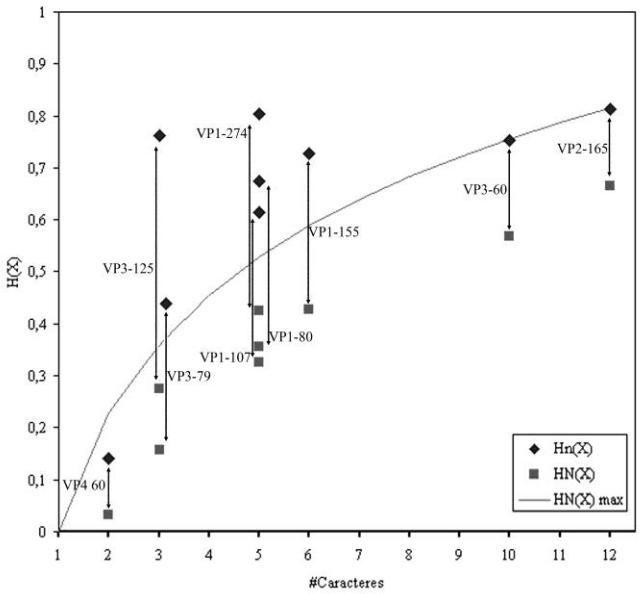


Tabla 2. Frecuencia de aparición de restos aminoacídicos en las posiciones de interés, según el alineamiento obtenido con Blastp/Cobalt. Se indica la frecuencia hallada de los residuos correspondientes a cada variante parental. La columna Hn(X) da los valores obtenidos para cada posición de la función Entropía de Shannon normalizada, para cada columna del alineamiento, referida a la cantidad de caracteres diferentes cuyo máximo es 21 caracteres (20 aa y - deleción). El gráfico a la derecha muestra, para los residuos en la región P1, en rombos negros Hn(X) para cada posición, y HN(X), cuadrados grises, donde la línea continua muestra el límite máximo de la función HN(X).

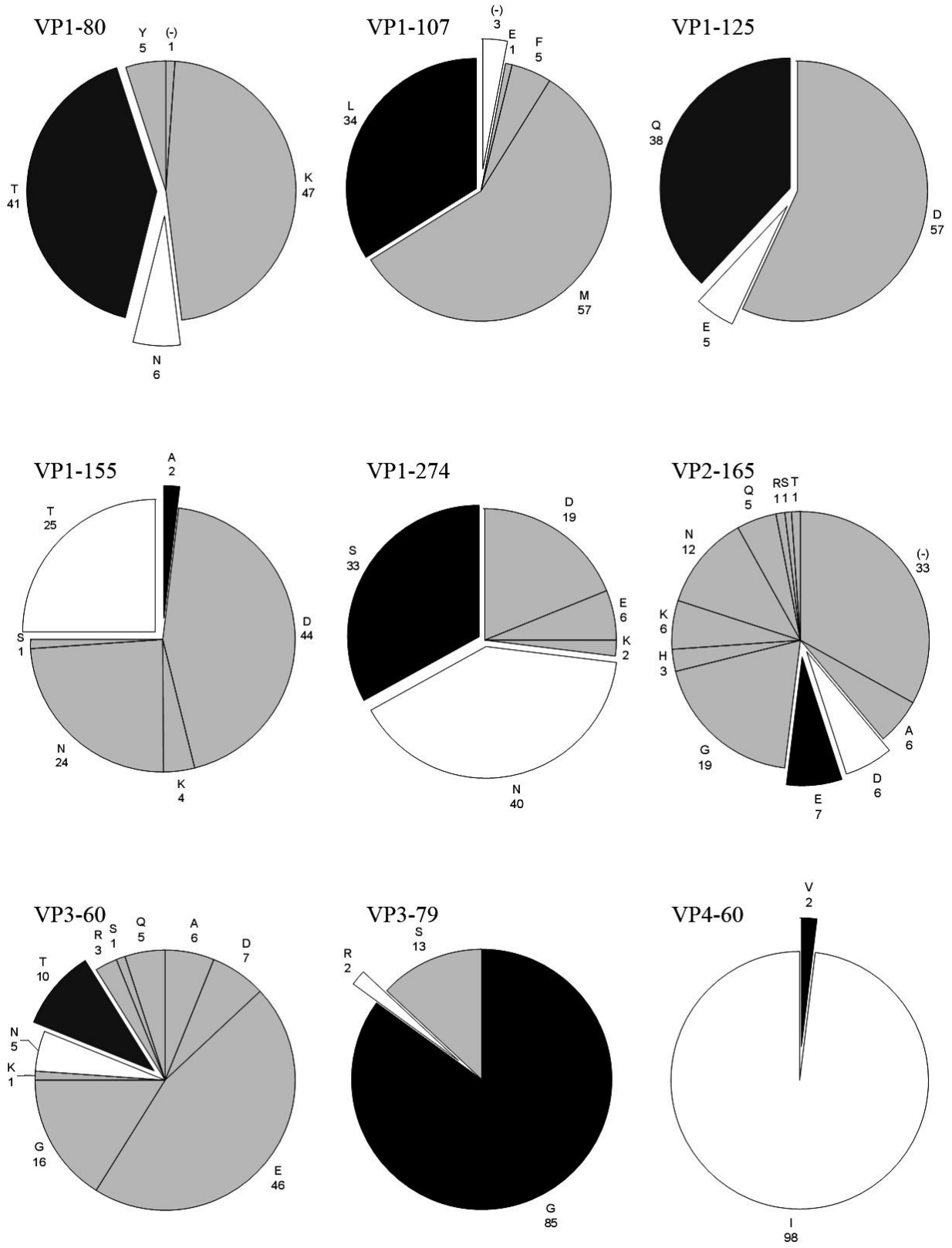


Figura 12. Frecuencia de aparición de restos aminoacídicos en las posiciones de interés, según el alineamiento obtenido con Blastp/Cobalt. En dichos diagramas se indican el aminoácido encontrado (letras) y debajo su abundancia en base a las 100 secuencias alineadas. El residuo concordante a 1N, 1 Nm y a otros enterovirus, se resalta respectivamente en blanco, negro y gris en el diagrama.

A continuación las secuencias aminoacídicas de CVB1N y CVB1Nm se alinearon con las secuencias completas de otros CVBs y con el virus altamente relacionado SVDV, obtenidas de la base taxonómica del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/), con el programa Vectors 10.1.1 usando el algoritmo Clustal X, del análisis de estos datos surge que dichas mutaciones se encuentran mayoritariamente en regiones de alta variabilidad de la secuencia o calientes, excepto VP3 79, VP1 274 y VP4 60. Siendo más frecuentes los hallados en CVB1Nm en el caso de VP3 79 y VP1 274, con excepción de VP4 60 (Figura 13).

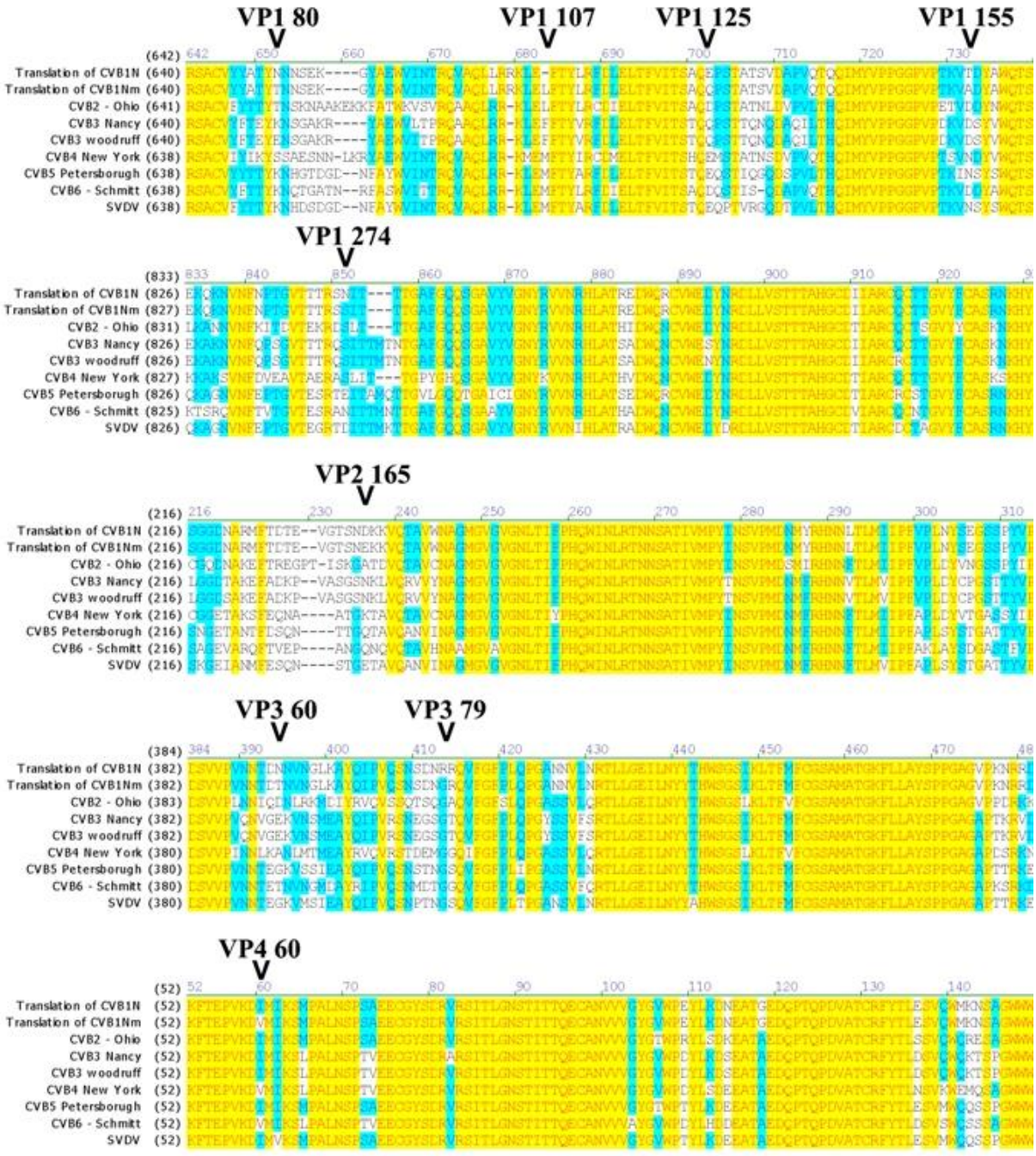


Figura 13 Alineamientos de la poliproteína de CVB1N, 1Nm y otros CVB usando el algoritmo ClustalX. La posición de las mutaciones se halla marcadas con una cuña sobre la cual se especifica la posición aminoacídica mutada.

1.3 Discusión

Es aceptado que pocas diferencias genómicas pueden llevar a cambios relevantes de fenotipo en los virus ARN (Domingo, Martin y col. 2006). En el estudio de la secuencia de CVB1Nm se hallaron 23 diferencias con respecto a CVB1N, de las cuales 5 no se consideran relevantes porque son mutaciones silenciosas dentro del ORF. Las 18 diferencias restantes, de las cuales una es una inserción, fueron analizadas ya que son candidatas a ser determinantes patogénicos moleculares.

De particular interés son las mutaciones dentro de la región 5'UTR. La mutación en el nt 35 se encuentra fuera de la región del IRES por lo que en principio no debiese afectar la traducción de la poliproteína, pero quizás pueda influenciar en la replicación viral, como se ha sugerido (Hunziker, Cornell y col. 2007). Aún así, sería poco probable que sea un determinante importante de patogenicidad ya que se ha encontrado que virus deletéreos del *cloverleaf* replican y persisten *in vivo* (Kim, Tracy y col. 2005). De las 4 mutaciones restantes, 3 se encuentran en el IRES, 2 de ellas ubicadas en el *stem loop* II, y 1 entre el IRES y el codón de inicio AUG. Esta región se ha reportado como sitio poseedor de determinantes patogénicos en la infección por CVB3 (Chapman, Ramsingh y col. 1997; Dunn, Chapman y col. 2000), y de virulencia en ensayos con CVB1 (Rinehart, Gomez y col. 1997; Zhong, Li y col. 2008). Del análisis en conjunto del 5'UTR, se puede concluir que los nucleótidos más frecuentemente hallados en los alineamientos se corresponden a los de CVB1Nm. Esto hace candidata a esta región de ser la responsable del fenotipo atenuado de CVB1N, aunque ya se ha descrito, en estudios no publicados previos, que esta región no es responsable por si sola del fenotipo patogénico de CVB1Nm.

La región P1, que codifica para la cápside viral, exhibe 9 diferencias en la secuencia aminoacídica, codificadas por las 8 mutaciones y la inserción de 1 codón. En la literatura se ha reportado que en esta región existen importantes determinantes de patogenicidad de CVB (Knowlton, Jeon y col. 1996; Harvala, Kalimo y col. 2002; Stadnick, Dan y col. 2004; Harvala, Kalimo y col. 2005). En nuestros alineamientos con otros enterovirus, se observa que I en la posición VP4 60 esta muy conservada, y podría suponerse *a priori* que el cambio I→V no sería responsable del cambio en la virulencia de CVB1Nm. Esta afirmación se basa en que la presión de selección mantiene ciertas posiciones con baja variabilidad ya que estos residuos aminoacídicos son beneficiosos para la propagación del virus. La contracara de esta situación es G en VP3 79, la cual esta muy conservada, por lo que R→G contribuiría favorablemente,

aplicando el mismo razonamiento. VP1 155 está mayoritariamente conservada, lo que se evidencia por el valor de Hn(X). En el caso de A, correspondiente a CVB1Nm, es frecuentemente hallada en dicha posición, en cambio T, correspondiente a CVB1N, es poco frecuente. Un análisis similar es aplicable a VP1 107, ya que L es frecuentemente encontrada y siendo ésta una posición conservada según los valores obtenidos de H(X), probablemente la deleción en CVB1N reduzca el *fitness*. Análisis equivalentes son aplicables a los residuos hallados en CVB1Nm en las posiciones VP1 80 y VP1 125, beneficiando a la variante CVB1Nm vs. 1N. En VP1 274 ambos residuos son frecuentemente hallados, con un valor intermedio de variabilidad en la posición, y por lo tanto N→S, sería poco probable que contribuya al cambio de fenotipo. Las posiciones VP2 165, VP3 60 son las que se presentan muy poco conservadas, siendo posiciones muy calientes con respecto a la variabilidad del virus, y *a priori*, es difícil estimar su contribución. En resumen, se podría decir que en la región P1, con ciertas excepciones, los residuos encontrados en CVB1Nm son más frecuentemente hallados en los alineamientos que sus contrapartes de CVB1N, lo que puede ser un indicio de reversión de la atenuación.

Las mutaciones en la polimerasa viral 3D pueden dar como consecuencia una alteración en el proceso de replicación. La tasa de error de copia, aunque elevada en los virus ARN, esta finamente ajustada a una ventana de valores. De ser muy alta, el virus entra en una etapa de "error catástrofe" en el cual el virus comienza a perder su información genética y la progenie viral se halla sentenciada a la extinción, acorde a la teoría de las cuasiespecies (Domingo, Martin y col. 2006) y comprobado en ciertos estudios (Pfeiffer y Kirkegaard 2003). Por otro lado, un cambio en la polimerasa viral que lleve a una alta fidelidad en el proceso de copia puede llevar a una disminución en el *fitness* viral, siendo menos adaptable al entorno, como se ha mostrado experimentalmente (Vignuzzi, Stone y col. 2005). En nuestro caso es obvio que nuestros virus se hallan por debajo de la tasa de "error catástrofe", solo por el hecho de haberlos podido propagar. Sin embargo, pueden diferir en la tasa de error y por lo tanto en la adaptabilidad. Analizando las 3 mutaciones en la región que codifica la polimerasa viral 3D, se observa que estas posiciones se hallan muy conservadas. En el caso de la posición 3D-78, el cambio V→I es muy poco probable ya que V esta muy conservado, lo que se vería como un cambio poco beneficioso para 1Nm. A la inversa, en las posiciones 3D-351 y 3D-444, los respectivos cambios C→Y y A→R, llevan a residuos aminoacídicos muy conservados y por ende debiesen ser beneficiosos ya que son rasgos mantenidos por la presión de selección. Sin embargo, considerando el virus recombinante C69-6365, mutaciones son prescindibles para obtener el fenotipo patogénico de CVB1Nm.

En este capítulo hemos analizado cuales podrían ser las regiones implicadas en el cambio de fenotipo de CVB1N a CVB1Nm, e hipotetizado en base a la conservación de residuos y la frecuencia de los residuos hallados en alineamientos con otros virus, que cambios podrían ser mejores candidatos a ser los determinantes de patogenicidad entre ambas variantes intratípicas. En los próximos capítulos se mostraran los resultados de las estrategias utilizadas para tratar de revelar su contribución.

Capítulo 2. Construcción de virus recombinantes

Para acotar aún más que segmentos subgenómicos del virus CVB1Nm son responsables del fenotipo de placa distinto y a cuales se debe la mayor patogenicidad observada luego de su inoculación en ratones, con respecto a CVB1N, se diseñaron virus recombinantes adicionales a las variantes quiméricas previas. Se procedió al diseño de virus recombinantes donde diferentes segmentos del genoma de CVB1N fueron reemplazados por segmentos equivalentes de CVB1Nm, mediante la estrategia de utilizar enzimas de restricción con sitio único de corte.

2.1 Construcción de nuevos virus recombinantes

Se obtuvieron cuatro nuevos clones infecciosos a partir de pN14 y las quimeras previas pC69-6365 y pC69-805. Estos clones se digirieron con enzimas de restricción que cortan en sitios únicos dentro de cada plásmido. Luego de la digestión los fragmentos de interés fueron purificados y los mismos ligados entre sí utilizando la enzima T4 polimerasa. Luego se transformaron bacterias competentes a fin obtener el clon y en todos los casos las colonias fueron chequeadas por PCR (usando primers descriptos en Materiales y Métodos). De esta manera se construyeron pC932-2288 usando *ClaI* y *Bstz17I7*, pC3438-6365 usando *EcoRV* y *BstEII*, pC69-1847 con *SfuI* y *SmaI*, y pC69-4318 utilizando *SfuI* y *EagI*.

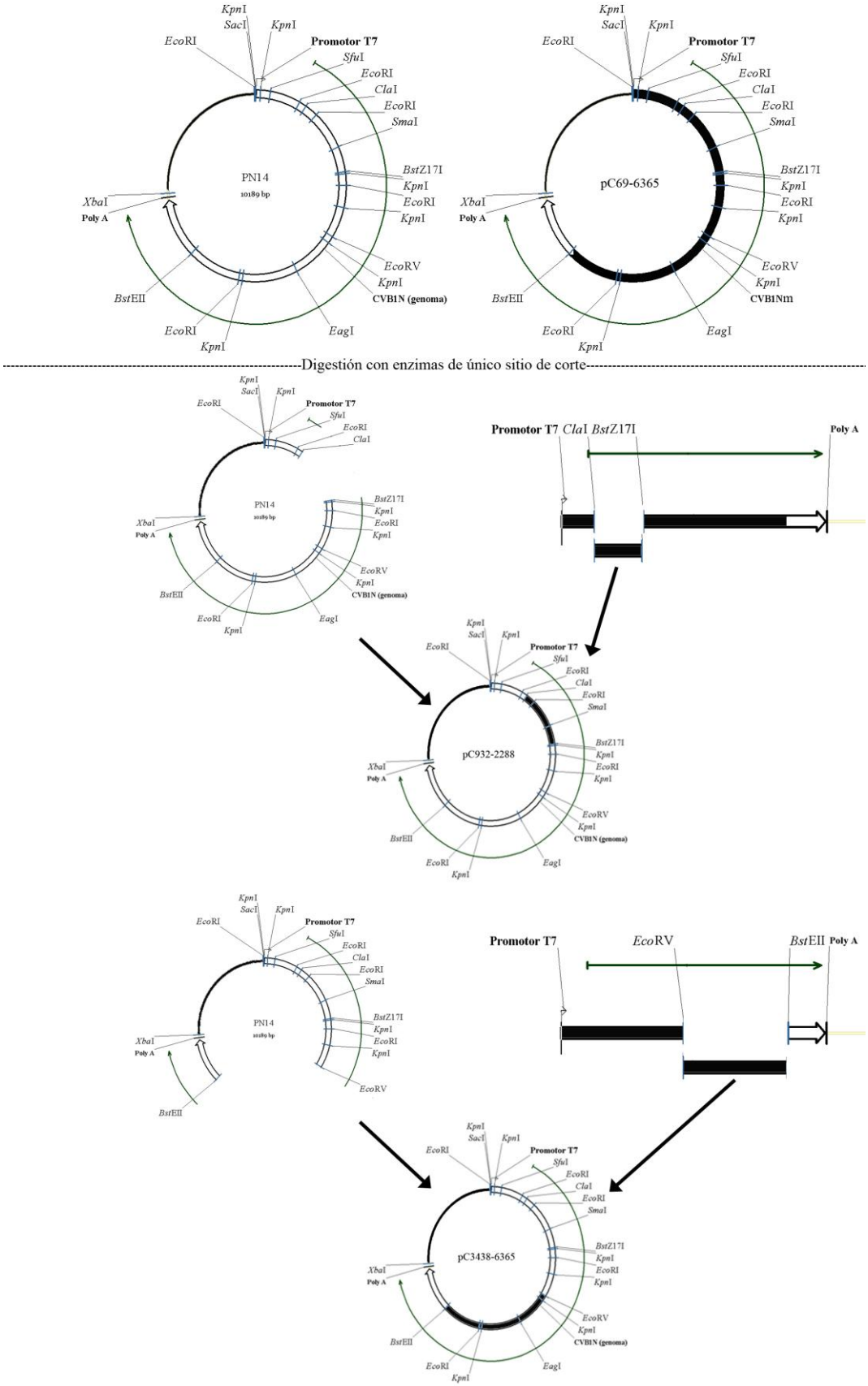


Figura 14. Esquema de la obtención de nuevos clones infecciosos usando la estrategia de único sitio de corte. Se muestran los plásmidos de partida usados para obtener los nuevos clones y se indican las enzimas de restricción usadas a tal fin.

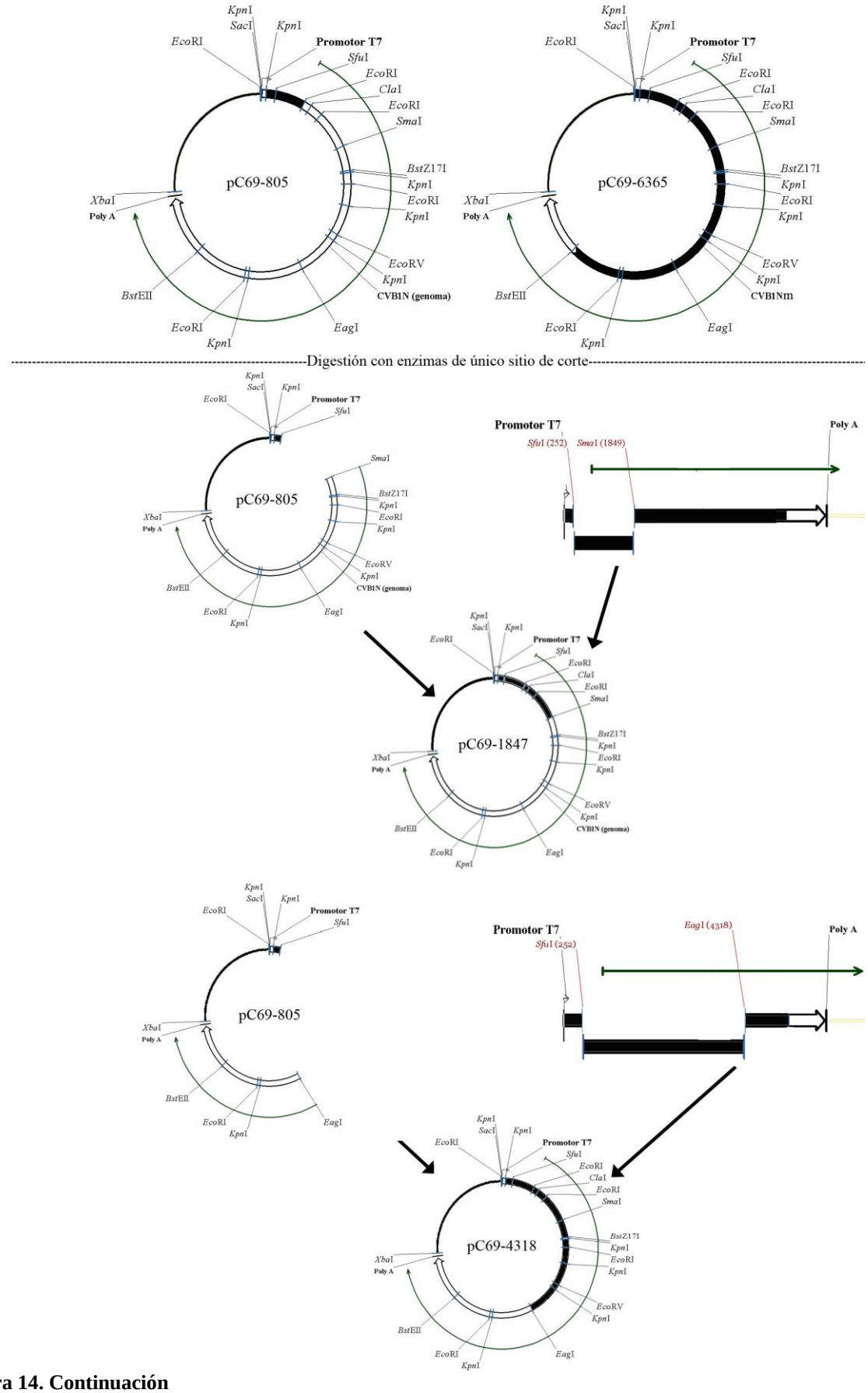


Figura 14. Continuación

2.2 Obtención de los virus

Habiéndose obtenido ADN plasmídico de los respectivos clones, se procedió a la digestión de los mismos utilizando *XbaI*, que posee un único sitio de corte detrás de la cola PolyA (Figura 14). Los clones digeridos fueron utilizados para realizar transcripción *in vitro* con la enzima T7, cuyo promotor está ubicado por delante del genoma viral. Los ARN resultantes fueron transfectados utilizando dextrano sobre células HeLa y se mantuvieron en observación a la espera de la aparición de efecto citopático y el consecuente rescate de virus infeccioso. Se obtuvieron un total de 4 virus recombinantes denominados C69-1847, C69-4318, C3438-6365 y C932-2288, indicando la numeración el número de los nucleótidos de la secuencia publicada de CVB1N reemplazados por el segmento equivalente de CVB1Nm.

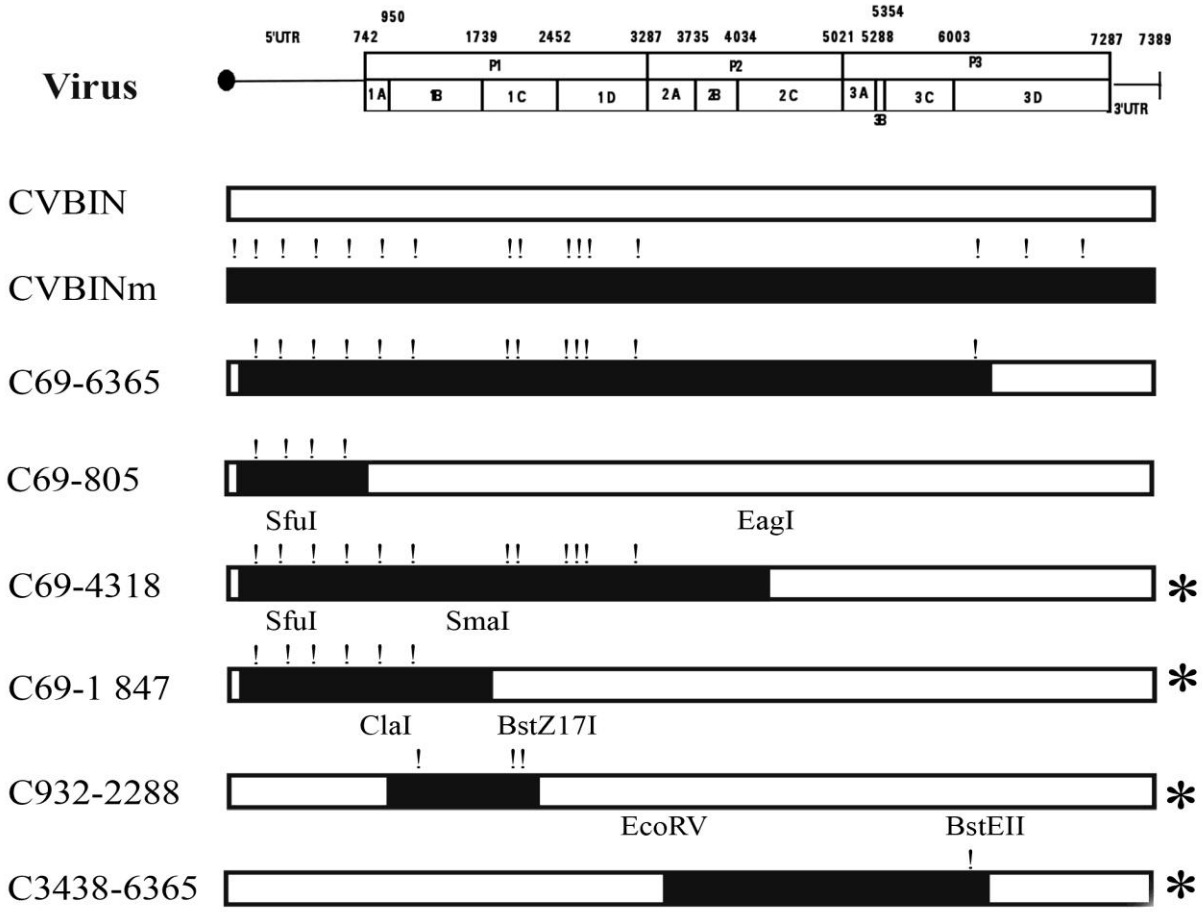


Figura 15. Esquema representativo de los virus recombinantes obtenidos. Los bloques blancos representan secuencia genómica de CVB1N mientras que los negros a CVB1Nm. Las enzimas de restricción utilizadas se detallan arriba de cada segmento. En el esquema el signo (!) marca las posiciones con mutaciones relevantes, según fue hallado en la secuenciación, en el 5'UTR o en la región del ORF que alteran la secuencia aminoacídica en la poliproteína en CVB1Nm. El signo (*) marca los virus originados a partir de las nuevas construcciones.

2.3 Discusión

Existen diversos trabajos que relacionan la región 5'UTR con el carácter patogénico de los CVB y en particular, con el fenotipo miocardítico como ya se ha comentado. De resultados previos sabíamos que C69-805, que contiene el 5'UTR perteneciente a CVB1Nm, es un virus de escasa patogenicidad, tanto en páncreas como en corazón. Sin embargo, no se puede aseverar que esta región no influye significativamente en el fenotipo patogénico de CVB1Nm, ya que la misma podría ser necesaria para obtener el fenotipo patogénico completo, pero insuficiente *per se* para que C69-805 provoque pancreatitis y/o miocarditis. Al respecto, Tracy y Gauntt han comentado (Tracy y Gauntt 2008) que el SLII responsable del fenotipo patogénico de un CVB3, confiere bajos niveles de patogenicidad al ser insertado en otro CVB3 no patogénico, interpretando que factores genómicos por fuera del SLII pueden mitigar el fenotipo patogénico (Tracy y Gauntt 2008). Otra interpretación plausible es que distintos determinantes patogénicos en diferentes partes del genoma sinergizan. En este sentido se ha sugerido que, en el caso de Polio, la interacción entre el IRES y las proteínas VP pueden intervenir en el *switch* traducción/encapsidación (Johansen y Morrow 2000), explicando entonces que cambios en una u otra región podrían afectar dichas interacciones. Teniendo esta posibilidad en mente se decidió virus recombinantes que contuvieran el 5'UTR mutado, además de otras regiones.

El virus recombinante C69-6365 carece de 2 de las mutaciones halladas (ambas en la región que codifica la polimerasa viral 3D), y retiene completamente el fenotipo exhibido por CVB1Nm. Por esta razón dichas mutaciones no fueron contempladas como prioridad en la construcción de nuevos virus recombinantes.

Las 4 construcciones nuevas, generadas a partir de clones preexistentes de CVB1, fueron diseñadas para evaluar distintas regiones subgenómicas adicionales (C69-1847, C69-4318, C3438-6365 y C932-2288).

En el caso de C69-4318 incluye el 5'UTR y la totalidad de las mutaciones halladas en la región P1. En cambio C69-1847 también contiene el 5'UTR pero solo las mutaciones en VP4 y VP2 de P1. Ambos nos permitirán evaluar las mutaciones del 5'UTR con subregiones de P1. C932-2288 contiene las mutaciones de VP2 y las de VP3, pero carece del 5'UTR. Con C3438-6365 que solo incluye la mutación nt 6133, que cambia V→I en la polimerasa 3D, se evaluara cual es el impacto de esta en el fenotipo.

Capítulo 3. Análisis de las regiones genómicas de CVB1Nm responsables del cambio de fenotipo *ex vivo*

Ciertas características virales pueden ser estudiadas sobre células en cultivo. En particular, en este capítulo se evalúan los cambios en el fenotipo de placa, las curvas de crecimiento y la citotoxicidad inducida entre las variantes parentales y los virus recombinantes, a fin de relacionar estos parámetros con las regiones genómicas y las diferentes mutaciones que comprenden. La finalidad de este estudio es poner en evidencia posibles cambios que contribuyan a la patogenicidad, que en un modelo *in vivo* son de difícil detección o quedarían enmascarados por factores del huésped tales como la respuesta inmune a la infección viral.

3.1 Fenotipo en placa sobre células HeLa.

Para evidenciar que fenotipo de placa exhiben los virus recombinantes descriptos en el capítulo anterior, se procedió a ensayar la formación de placas a las 48 hs pi sobre células HeLa. Como control se utilizaron las variantes parentales. Como bien se puede apreciar, las nuevas quimeras guardaron un fenotipo de placa en relación con el 5'UTR que poseen. La quimera C69-1847 que posee el 5'UTR de CVB1Nm exhibe fenotipo de placa grande y en contraparte C932-2288 exhibe un fenotipo de placa diminuta, similar a CVB1N.

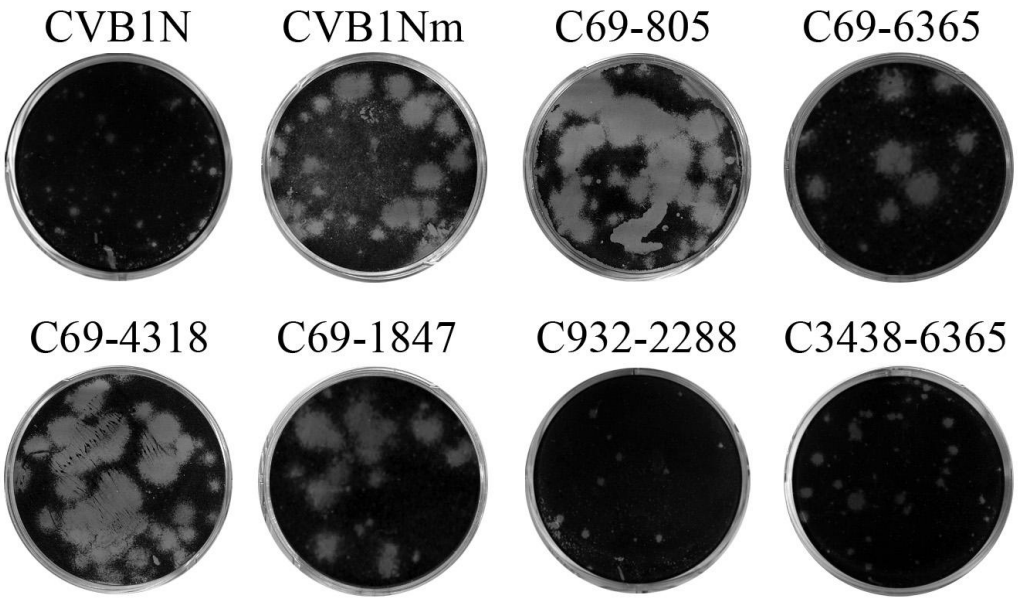


Figura 16. Fenotipos de placa. Se muestran las diferencias en el fenotipo de placa que exhiben las variantes parentales y los virus recombinantes. El fenotipo de placa correlacionó con la región 5'UTR parental.

3.2 Curva de crecimiento de un paso en células HeLa

Se estudió la velocidad de replicación viral de los virus parentales y los virus recombinantes quiméricos como uno de los parámetros de virulencia. Para esto se realizaron curvas de crecimiento en un solo paso sobre células Hela. Se observó que todos los virus replican eficientemente en estas células. Sin embargo, se pudo apreciar que la velocidad de replicación de la variante CVB1Nm y de los virus recombinantes que incluyeron su 5'UTR, mostraron una velocidad de replicación mayor que CVB1N y los virus recombinantes que conservaron el 5'UTR de CVB1N.

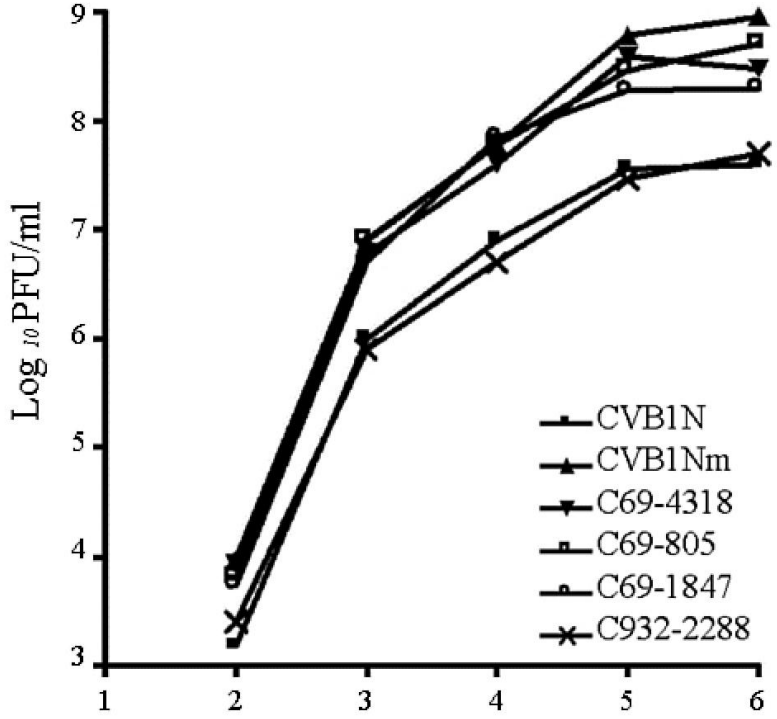


Figura 17. Curva de crecimiento. Las curvas de crecimiento en un único paso fueron realizadas en HeLa para las diferentes variantes parentales y los virus recombinantes. Se infectaron células HeLa a 10 MOI, y cada hora pi se fueron cosechando monocapas celulares para analizar infectividad viral. Se puede inferir que el 5'UTR mutante correlaciona con el incremento en la tasa replicación en células Hela.

3.3 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa y RD

Para evidenciar el efecto citotóxico de las variantes virales se procedió a realizar el ensayo para medir la viabilidad de células infectadas usando MTT. Para ello se infectaron líneas celulares con 100 UFP, Hela y RD. La citoxicidad inducida por las variantes virales a las 16 hs en células HeLa, fue mayor en aquellos virus que poseen el 5'UTR mutante. En el caso de células RD, línea celular de progenie muscular humana, la citoxicidad no presento diferencias significativas.

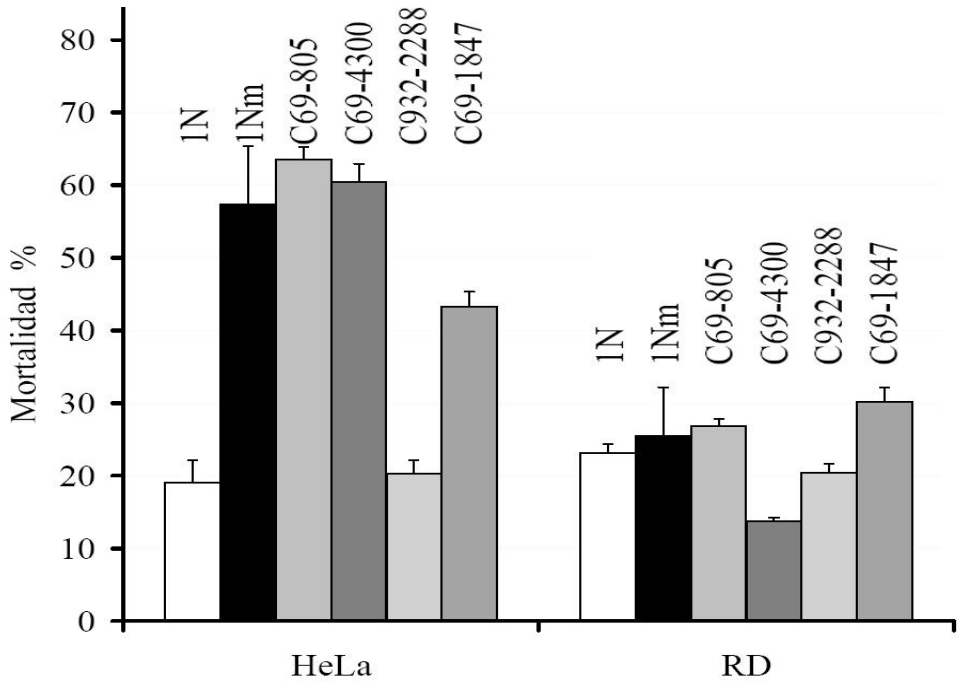


Figura 18. HeLa y RD a las 16 y 24 hs de incubación, respectivamente. En las células HeLa se asocia el mayor efecto citotóxico al 5'UTR de CVB1Nm. En contraste no se observa diferencias significativas en células RD.

3.4 Discusión

En este capítulo observamos el comportamiento *ex vivo* de los virus recombinantes y parentales, CVB1N y CVB1Nm. Se estudio el fenotipo de placa para relacionarlo con las regiones genómicas mutadas, y también como marcador de virulencia (Jimes y Jamison 1983), a fin de correlacionar luego éste parámetro con el carácter patogénico *in vivo* de estas variantes, como otros autores han realizado (Zhang, Yousef y col. 1994). Hemos observado, al igual que otros autores (Zhong, Li y col. 2008), que el cambio en el fenotipo de placa se debe a determinantes en el 5'UTR. Otros autores han hallado que cambios en la región P1 también pueden afectar dicho fenotipo (Ramsingh y Collins 1995). En nuestros ensayos el fenotipo de placa obtenido esta relacionado con el 5'UTR que poseen los virus, correlacionando el fenotipo de placa grande con el 5'UTR mutante de CVB1Nm, mientras que el fenotipo de placa pequeña, similar a la de CVB1N, lo poseen los virus recombinantes con el 5'UTR original.

En el caso de la curva de crecimiento de un paso en células HeLa, estas curvas correlacionaron de igual manera con respecto a la velocidad de crecimiento. Se observó que los virus que poseen el 5'UTR mutante generan 10 veces más virus a las 6 hs pi que los que poseen el 5'UTR de CVB1N.

Finalmente se estudió la citotoxicidad de los virus recombinantes y parentales sobre células HeLa y células RD, un tipo celular que expresa muy bajos niveles de CAR. Los valores mostraron que la citotoxicidad sobre células HeLa también está relacionada con la presencia del

5’UTR mutante; sin embargo esta relación no es seguida por la citotoxicidad sobre células RD. Las células RD fueron utilizadas con el fin de relacionar la citotoxicidad con uso de receptores, sin embargo, no se puede inferir que los valores obtenidos sobre estas células este relacionado con los mismos; probablemente otros factores intracelulares, como factores de inicio de traducción estén implicados (Bonderoff y Lloyd 2008).

En resumen, el 5’UTR correspondiente a CVB1Nm, al ser comparado con el 5’UTR perteneciente a CVB1N, aumenta en la tasa de replicación viral, incrementa la citotóxicicidad y correlaciona con el rasgo fenotípico de placa grande en los virus que lo contienen, al menos en células HeLa.

Capítulo 4. Análisis de las regiones genómicas de CVB1Nm responsables del cambio de fenotipo *in vivo*

Para estudiar el fenotipo de los virus quiméricos en el modelo murino se procedió a evaluar la capacidad de replicar y de generar lesiones en 2 órganos blanco de interés, el páncreas y el corazón. A tal fin ratones C3H/HeJ de 21 días de edad que fueron infectados por vía intraperitoneal con los CVB1 parentales y recombinantes.

4.1 Replicación viral en páncreas y corazón de ratones C3H/HeJ inoculados con virus recombinantes a los 5 dpi.

Los animales fueron inoculados ip con 10^4 UFP del virus de interés. A los 5 días pi, los animales fueron sacrificados y los órganos fueron cosechados en condiciones asépticas para verificar la infectividad viral. Se detectaron aproximadamente 10^7 UFP por gramo de tejido en el páncreas y el corazón de ratones inoculados con CVB1Nm. En contraste, menos de 10^2 UFP/g fueron registradas con CVB1N, C69-805 y C3438-6365. Las quimeras C69-1847 y C932-2288y arrojaron valores de título intermedios como se muestra en Tabla 3

.

Tabla 3. Título viral (como Log $_{10)}$ por gramo de tejido en páncreas y corazón en ratonesC3H/HeJ infectados, sacrificados 5dpi.

Virus / Quimera	Título viral en páncreas	Título viral en corazón
CVB1N	<2	<2
CVB1Nm	7.5±0.8	6.6±0.6
C69-805	<2	<2
C69-6365	7.2±0.4	6.4±0.4
C3438-6365	<2	<2
C69-4318	7.1±0.7	6.2±0.6
C 69-1847	4.1±0.5	<2
C 932-2288	3.6±0.6	<2

4.2 Histopatología del páncreas y corazón de ratones C3H/HeJ inoculados con virus recombinantes a los 10 dpi

Se procedió a inocular ratones de 21 días de edad C3H/HeJ ip tanto con las variantes parentales, como con las quimeras generadas utilizando una solución de PBS conteniendo 10^4 UFP de virus. A los 10 dpi se sacrificaron dichos animales y los tejidos fueron fijados en paraformaldehído 4% pH 7.4 a fin de ser procesados para rutina histológica.

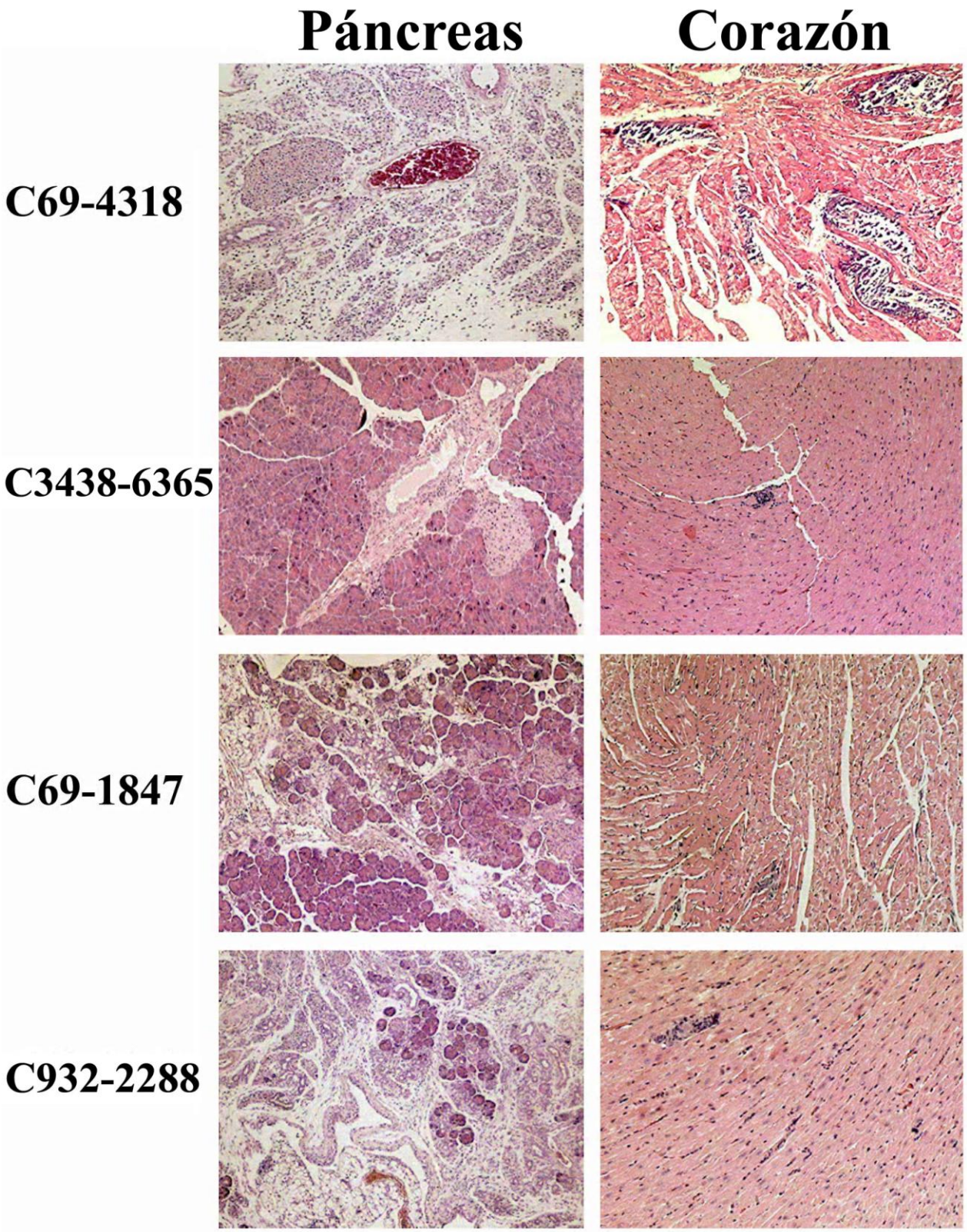


Figura 19. La histopatología de ratones C3H/HeJ inoculados con las quimeras virales. Imágenes representativas del fenotipo de los virus recombinantes luego de su inoculación en ratones C3H/HeJ en cortes de tejido pancreático y cardíaco teñidos con HyE. X250

El virus C69-4318 indujo una severa pancreatitis y miocarditis, similares a las observadas con el virus C69-6365. En contraste, los virus C3438-6365 y C69-805 no indujeron lesiones significativas ni en páncreas ni en corazón. Los virus C69-1847 y C 932-2288 indujeron ambos una pancreatitis importante, aunque de menor intensidad que los virus patogénicos. Algo notorio es que indujeron muy poca miocarditis, ya que solo se observaron pequeños y esporádicos focos necróticos en algunos animales (

Figura 9).

Tabla 4. Score patogénico de páncreas y corazón en animales inoculados con variantes parentales y recombinantes.

Virus	Páncreas	Corazón
CVB1N	0	0
CVB1Nm	4.0	3.1±0.3
C69-805	0.4±0.2	0.2±0.1
C69-6365	4.0	3.4±0.1
C3438-6365	0	0
C69-4318	4.0	3.6±0.4
C69-1847	2.8±0.6	0.8±0.6
C932-2288	2.3±0.8	0.7±0.5

4.3 Discusión

Considerando que el virus recombinante C69-4318 fue patogénico en niveles similares al parental CVB1Nm y al recombinante C69-6365, y que los virus recombinantes C3438-6365 y C69-805 fueron no patogénicos, puede concluirse que la región responsable del cambio de fenotipo de atenuado a patogénico estaría acotada a P1, ya que en esta región, responsable de codificar las proteínas de la cápside viral, se encuentran mutaciones de interés. El hecho de que los virus C69-1847 y C932-2288 indujeran una menor intensidad de pancreatitis en ausencia de miocarditis indicaría que los determinantes de patogenicidad pancreática y miocárdica son distintos, y/o que el evento pancreatitis debe ser más severo para que ocurra miocarditis. En este sentido, en este estudio hemos podido observar que siempre los títulos virales obtenidos de homogenatos de páncreas y corazón correlacionan con la histopatología. Sin embargo, en comparación con otros estudios donde los título de CVB fueron elevados en páncreas (~ 10^7 PFU/g de tejido), el mismo no correlacionó con el grado de pancreatitis (Gomez, Cui y col. 1993).

En C69-1847 contiene las mutaciones en regiones de VP3 y VP1, al compararlo con C69-4318. C932-2288 que incluye solo las mutaciones en VP2 y VP3, y excluye el 5’UTR y la

mutación en VP4. Ambos virus, como se dijo, son moderadamente pancreatíticos, y casi no miocardíticos, correlacionando en ambos órganos el titulo viral con la injuria tisular.

De C3438-6365 se observó que su fenotipo resultó igual a CVB1N, por lo cual concluimos que el cambio aminoacídico en la posición 3D 78 no es un determinante de patogenicidad.

C69-1847 al ser comparada con los resultados previos obtenidos con C69-805, que incluye la región 5'UTR de CVB1Nm y muestra muy baja patogenicidad similar a CVB1N, sugiere que una o las mutaciones en VP2 165 y VP4 60, son determinantes de virulencia importantes para el fenotipo pancreatítico, pero muy poco para el miocardítico.

En resumen, los títulos virales obtenidos de homogenatos de páncreas y corazón correlacionaron con la histopatología. Las mutaciones determinantes de enfermedad pancreática y cardíaca están ubicadas en la región P1. Dichos determinantes no serían idénticos o solaparon solo parcialmente. Los determinantes de pancreatitis están relacionados con las mutaciones de VP2, VP3 y VP4, quizás potenciados por el 5'UTR mutante, pero para obtener el fenotipo miocardítico completo son necesarias las mutaciones en VP1

Capítulo 5. Análisis de los cambios nucleotídicos de la cápside de CVB1Nm en estructuras tridimensionales

Previamente otros autores han resuelto las estructuras a nivel atómico de ciertos CV, así como las estructuras de los complejos virus-receptor de CVB3 con los dos receptores putativos, DAF y CAR. El presente capítulo aborda la utilización de estos modelos con el fin de inferir la ubicación de los residuos aminoacídicos que cambiaron entre CVB1N y CVB1Nm, correspondientes a las mutaciones de la región P1, que genera las proteínas estructurales de la cápside viral. También se buscara elucidar cuales son las relaciones espaciales existentes con el sitio de unión a los receptores, a fin asignar posibles roles al cambio de estos residuos, con respecto a las diferencias de fenotipo observado entre CVB1N y CVB1Nm. Por no disponer de las estructuras para CVB1, se buscará validar la utilización de estas estructuras en base a la similitud de secuencia con CVB3.

5.1 Validación del estudio utilizando la estructura cristalográfica de CVB3

El análisis comparado entre las secuencias de aminoácidos entre CVB1N y CVB3 muestra una similitud mayor del 80% entre las secuencias aminoacídicas correspondientes. Puede inferirse entonces una alta similitud en la estructura secundaria y en los plegamientos de orden superior, sugiriendo que la unión a los receptores sea similar. Asumido esto, fue posible mapear las mutaciones de la cápside viral entre las variantes intratípicas CVB1N y CVB1Nm sobre la estructura conocida a escala atómica por cristalografía de rayos X de CVB3 (Muckelbauer, Kremer et al. 1995). Como control, se realizó la comparación estructural entre CVB3 y el virus altamente relacionado SVDV (del inglés, *swine vesicular disease virus*) cuya estructura cristalográfica se halla disponible para variantes del virus (Fry, Knowles y col. 2003; Verdaguer, Jimenez-Clavero y col. 2003), y de esta manera poder esclarecer las eventuales divergencias entre las posiciónes de los restos aminoacídicos entre los diferentes modelos. Yuxtaponiendo las estructuras de Cα de CVB3 y SVDV pudimos observar en 3 dimensiones que los esqueletos de Cα se encuentran muy cercanos en el espacio entre los 3 modelos (Figura 20). Adicionalmente, se realizó un alineamiento de estas secuencias usando el encaje entre las estructuras cristalográficas de CVB3 y SVDV, poniendo como valor de corte la distancia 5Å entre las posiciones de los residuos aminoacídicos entre los modelos usando el programa Chimera. Luego se alineó CVB1N usando Clustal X. Como se puede observar en la Tabla 5, las estructuras secundarias entre los modelos cristalográficos se hallan muy conservadas, en tanto que la secuencia alineada de CVB1N muestra coincidencia en secuencia en muchas de estas

regiones estructurales, con lo que se puede predecir que poseen análogas estructuras secundarias. En conjunto, estos datos sugieren que la aproximación utilizada para mapear mutaciones de CVB1 es válida.

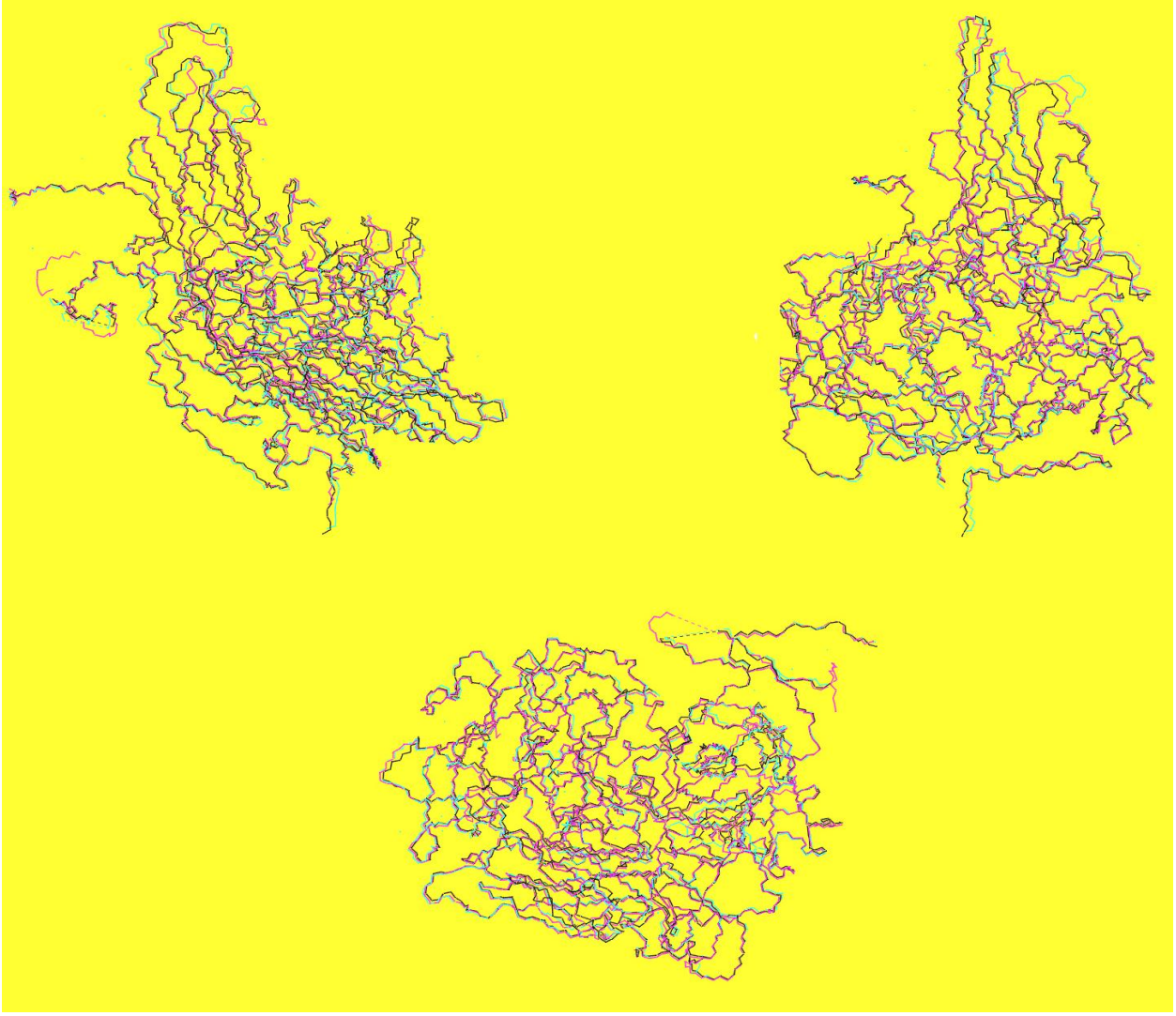
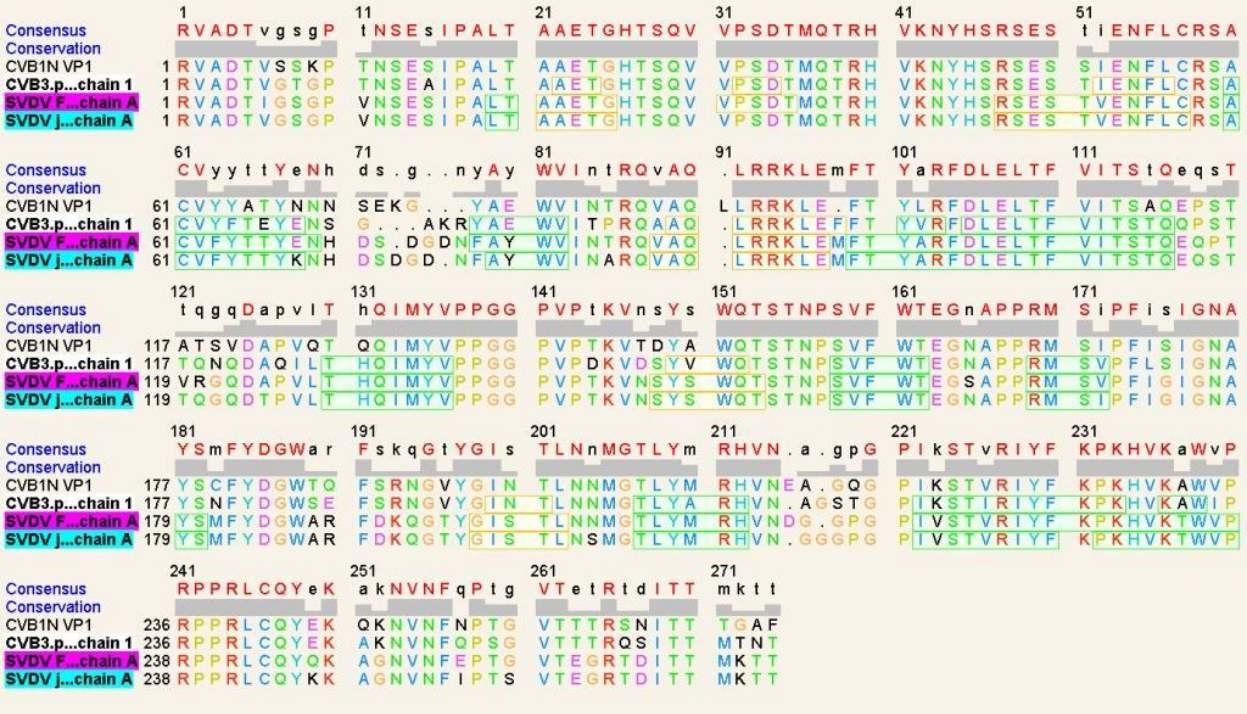


Figura 20. Se muestran 3 diferentes vistas del encaje entre los esqueletos de Cα de las estructuras cristalográficas de CVB3 (negro) y SVDV (elucidada por Fry en violeta y en celeste por Verdaguer). Se puede observar virtual coincidencia en los trazos del esqueleto carbonado α que conforman el protómero

Tabla 5. Alineamiento de VP1, VP2, VP3 y VP4, entre CVB1N con CVB3 y SVDV

VP1



VP2

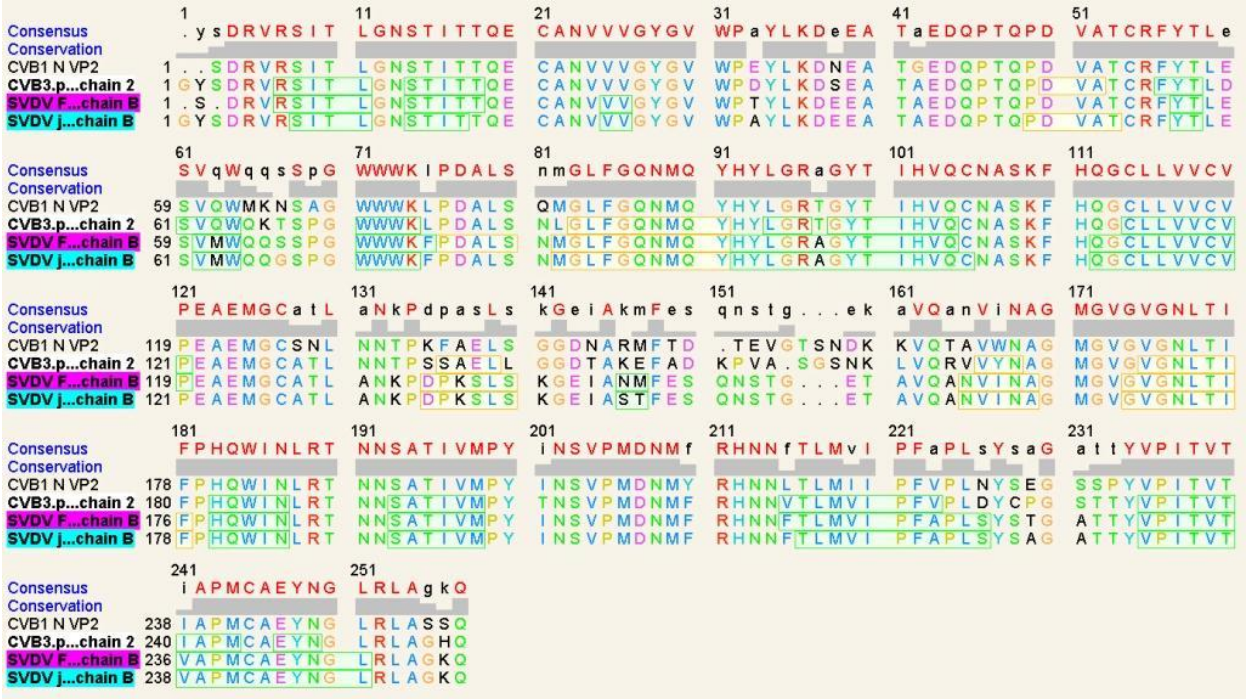
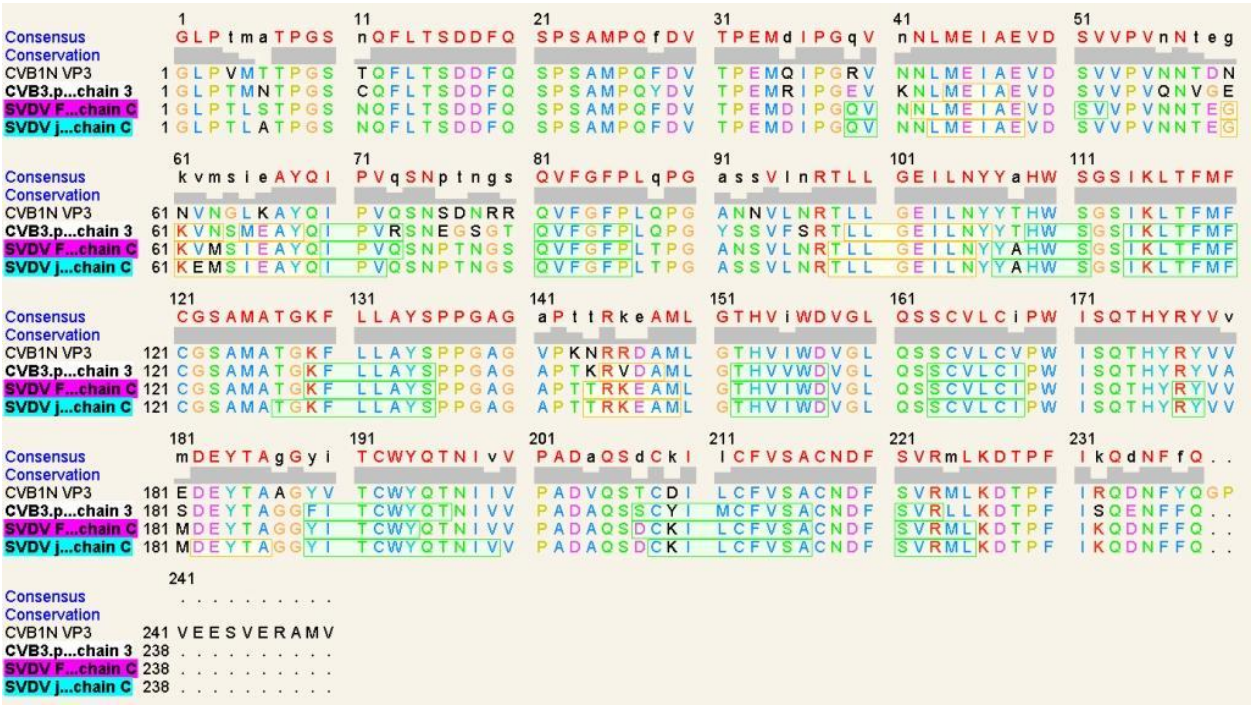
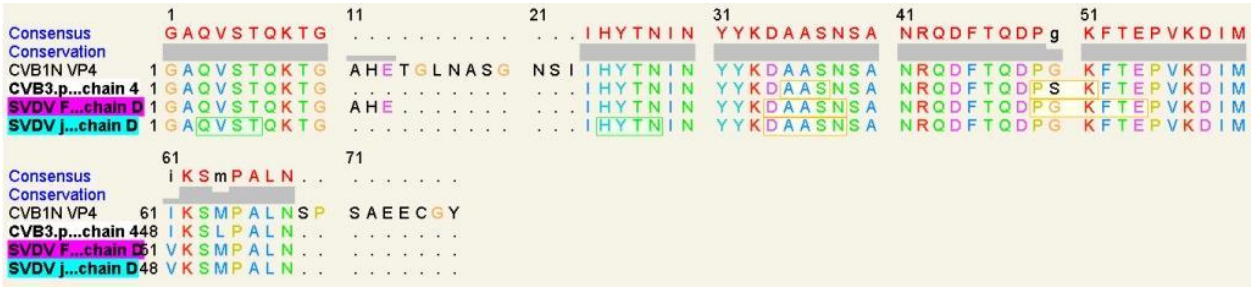


Tabla 5. Continuación.

VP3



VP4



Alineamientos de VP1, VP2, VP3 y VP4 correspondientes a CVB1N, CVB3 y 2 cepas de SVDV. La distancia entre residuos entre restos aminoacídicos pertenecientes a las cadenas carbonada α de CVB3 y SVDV es menor a 5Å. Los residuos enmarcados en cajas verdes corresponden a estructuras secundarias tipo hoja beta plegada, aquellos enmarcados en cajas amarillas corresponden a regiones hélice alfa. El símbolo (.) corresponde a resto excluidos del alineamiento. Se puede apreciar el alto consenso en la secuencia alineada y la importante conservación de la estructura secundaria entre los modelos cristalográficos.

5.2 Mapeo de las mutaciones de las variantes intratípicas de CVB1 sobre la estructura de CVB3

Usando el modelo de CVB3 se buscaron las posiciones donde se encuentran las diferencias entre las variantes intratípicas de CVB1 y de esta manera mapear su ubicación sobre la cápside viral. Explorando el mapa tridimensional desde el eje de simetría 5 y 3 (Figura 22 y Figura 23, respectivamente) se puede observar que ciertos residuos mutados se encuentran en la superficie externa de la cápside viral, mientras que otros residuos mutados no se hallan expuestos como VP1 107 y VP4 60 (Figura 23 C y D y Figura 22 C y D, respectivamente). En el caso de VP1 107, se halla formando parte del *pocket* y parece estar cercano al *pocket factor* (Figura 21).

Los residuos correspondientes a VP1 80, 125 y 155 se hallan cercanos al eje de quíntuple simetría, hallándose sobre los bucles B-C, D-E y F-G, respectivamente (Figura 23 C y D). VP2 165 se halla situado en el bucle E-F del *puff*, que es una saliente prominente en la estructura de CVB3 (Figura 22 C y D). VP3 60 se ve implicado en otra saliente, el *beta knob*, mientras que VP3 79 se halla en el bucle B-C de VP3 (Figura 22 C y D). Estos resultados se sumarizan en la Tabla 6 y en la Figura 24.

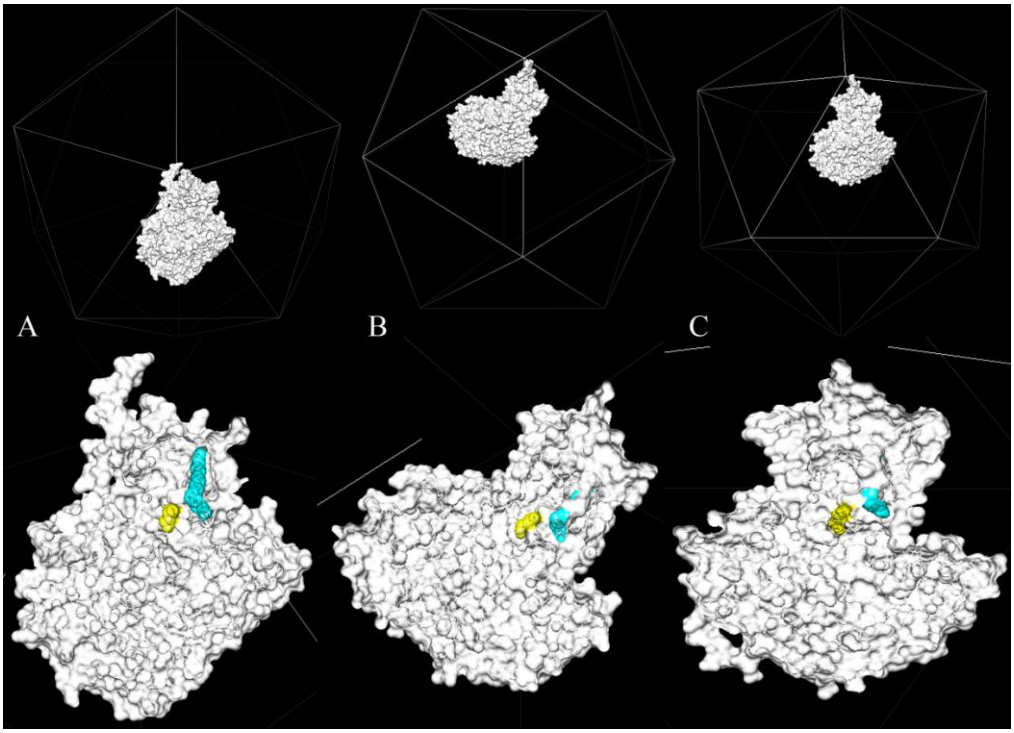


Figura 21. Se muestra la relación entre el residuo VP1 107 (amarillo) y el *pocket factor* (celeste) realizado sobre cortes del protómero desde tres vistas correspondientes al eje de quintuple simetría (A), de simetría doble (B) y de simetría triple (C).

Figura 22. (página 57)

Se muestran diferentes vistas desde el eje de simetría 3 de CVB3 donde se marcan la posición de los restos donde se produjeron cambios de aminoácidos de CVB1N a 1Nm. A: visión general de la cápside viral vista externamente al eje de simetría 3, donde la flecha señala la posición del mismo. B: corte ecuatorial de la cápside mostrando la posición del eje de simetría 3 (flecha). C: posición de las mutaciones en VP1 274, VP2 165, VP3 60 y 79 y VP4 80. D: disposición de los mismos residuos. En corte ecuatorial VP1 274, VP2 165, VP3 60 y 79 se hallan en la superficie externa sobre diferentes loops, en tanto que VP4 80 en la superficie interior de la cápside

Figura 23. (página 59)

Diferentes vistas desde el eje de simetría 5 de CVB3 donde se señalan la posición donde se produjeron cambios de aminoácido CVB1N a 1Nm. A: visión general de la cápside viral vista externamente eje de simetría 5, donde la flecha señala la posición del mismo. B: vista de un corte ecuatorial de la cápside mostrando la posición del eje de simetría 5 (flecha). C: ampliación de la vista de A con la posición de las mutaciones en VP1 80, 107, 125 y 155. D: ampliación de la vista B con la disposición de los mismos residuos. Se puede apreciar que VP1 80, 125 y 155 se hallan en la superficie externa sobre diferentes *loops* en la región del eje de simetría 5, en tanto que VP1 107 se encuentra en la base del *puff*, estando no expuesto a ninguna cara de la cápside.

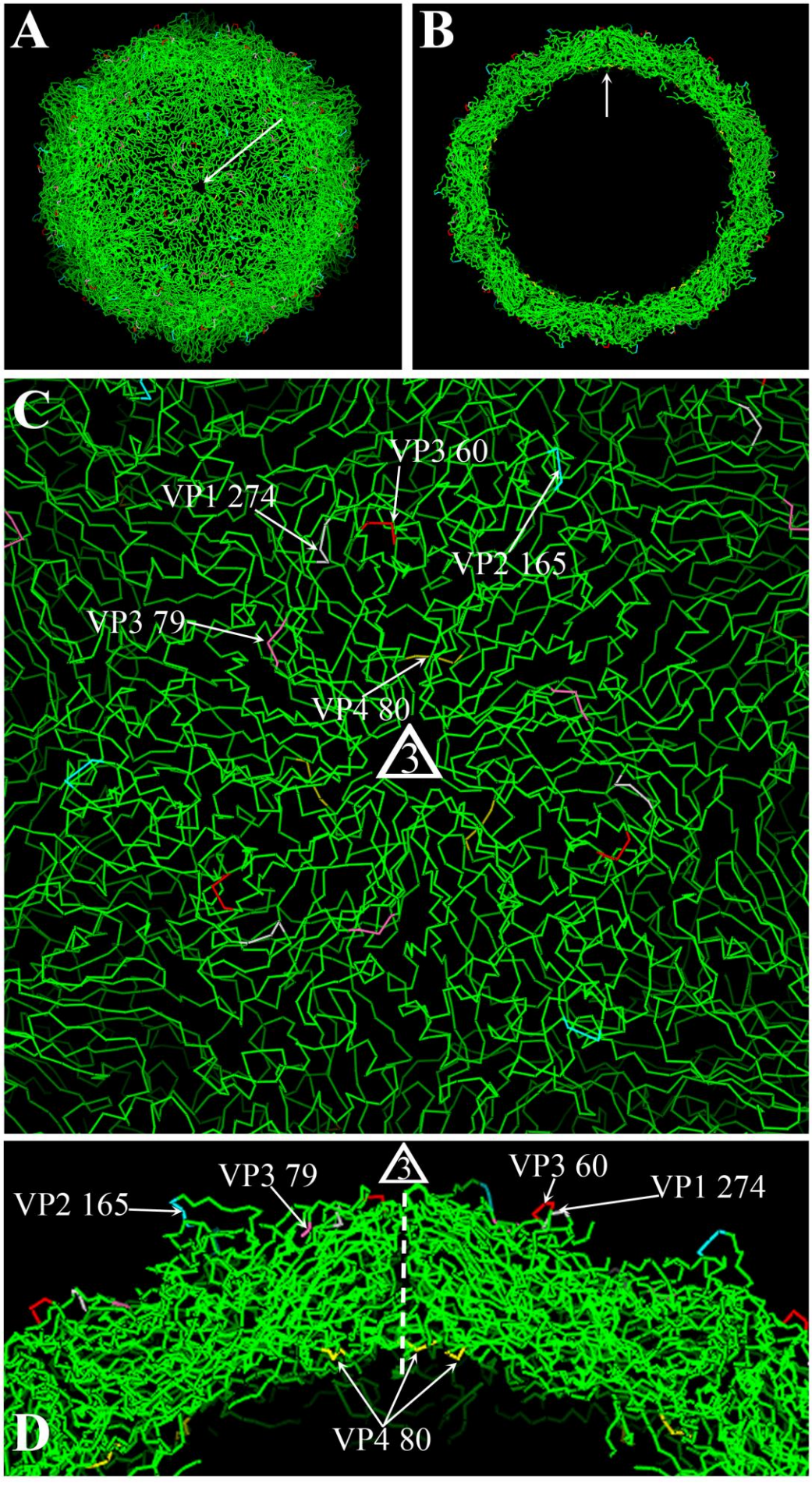

A
B
C
VP3 60
VP1 274
VP2 165
VP3 79
VP4 80
3
D
VP3 79
3
VP3 60
VP2 165
VP1 274
VP4 80

Figura 22.

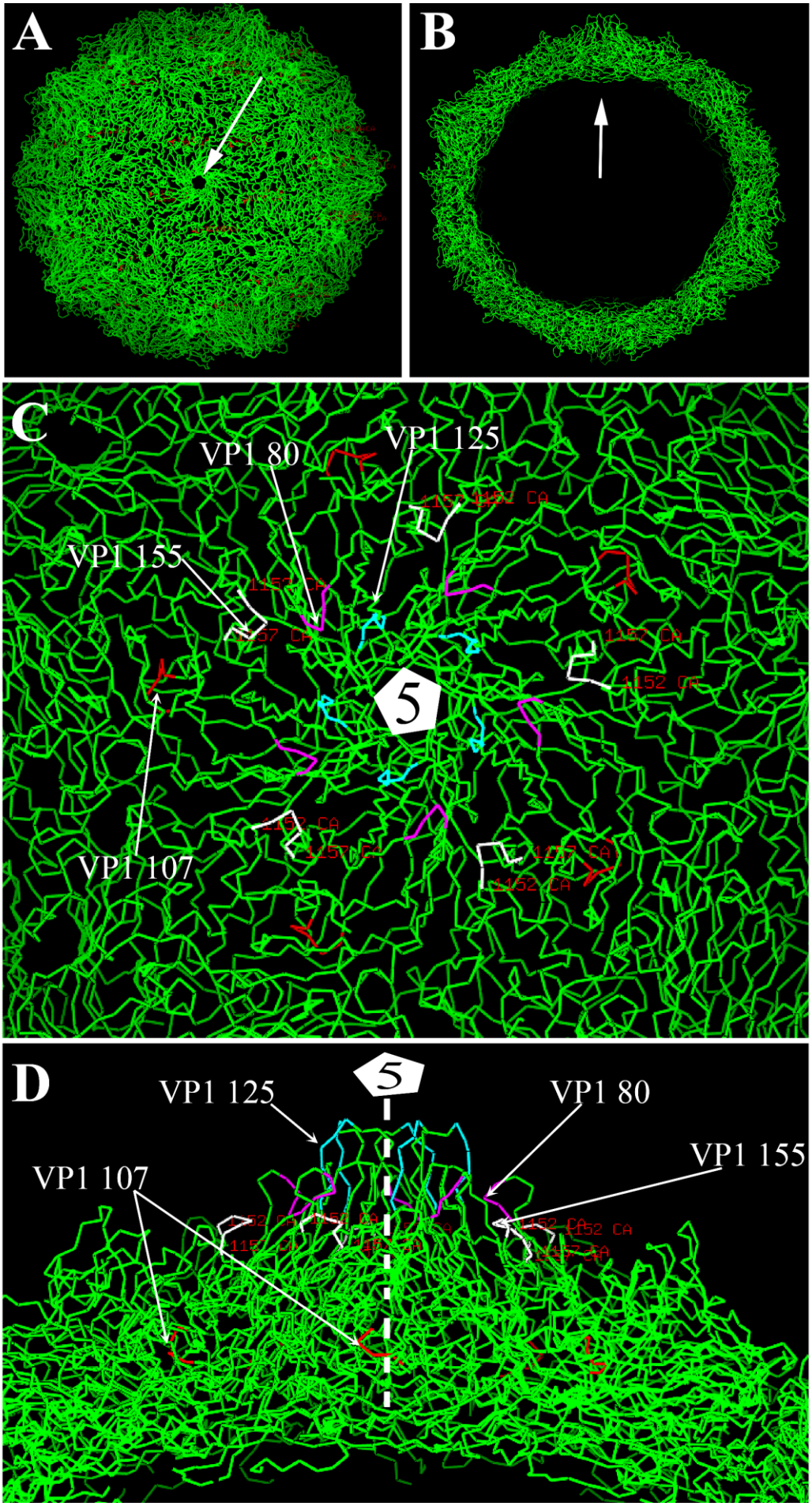

A
B
C
VP1 80
VP1 125
VP1 155
VP1 107
5
D
VP1 125
5
VP1 80
VP1 155
VP1 107

Figura 23.

Tabla 6. Posición de los cambios aminoacídicos en la cápside viral predicha sobre la estructura de CVB3.

Región de cápside	Cambios de aminoácido CVB1N → CVB1Nm	Localización en la estructura[a]
VP4	I→V, 60	Superficie interna de la cápside.
VP2	D→E, 165	E-F *loop* , *puff* (sitio antigénico 2A)
VP3	N→T, 60	*beta knob* VP3 (sitio antigenico 3A)
VP3	R→G, 79	B-C *loop* VP3 (sitio antigénico 3B)
VP1	N→T, 80	*Fivefold* / B-C *loop* VP1 (sitio antigénico 1)
VP1	L, 107	Aminoácido no expuesto a superficie, y debajo del *puff*
VP1	E→Q, 125	Vecindad al eje de quíntuple simetría (*fivefold*) D-E *loop* VP1
VP1	T→A, 155	Expuesto en la superficie externa en el *loop* F-G
VP1	N→S, 274	C-terminus de VP1 (sitio antigénico 3A)

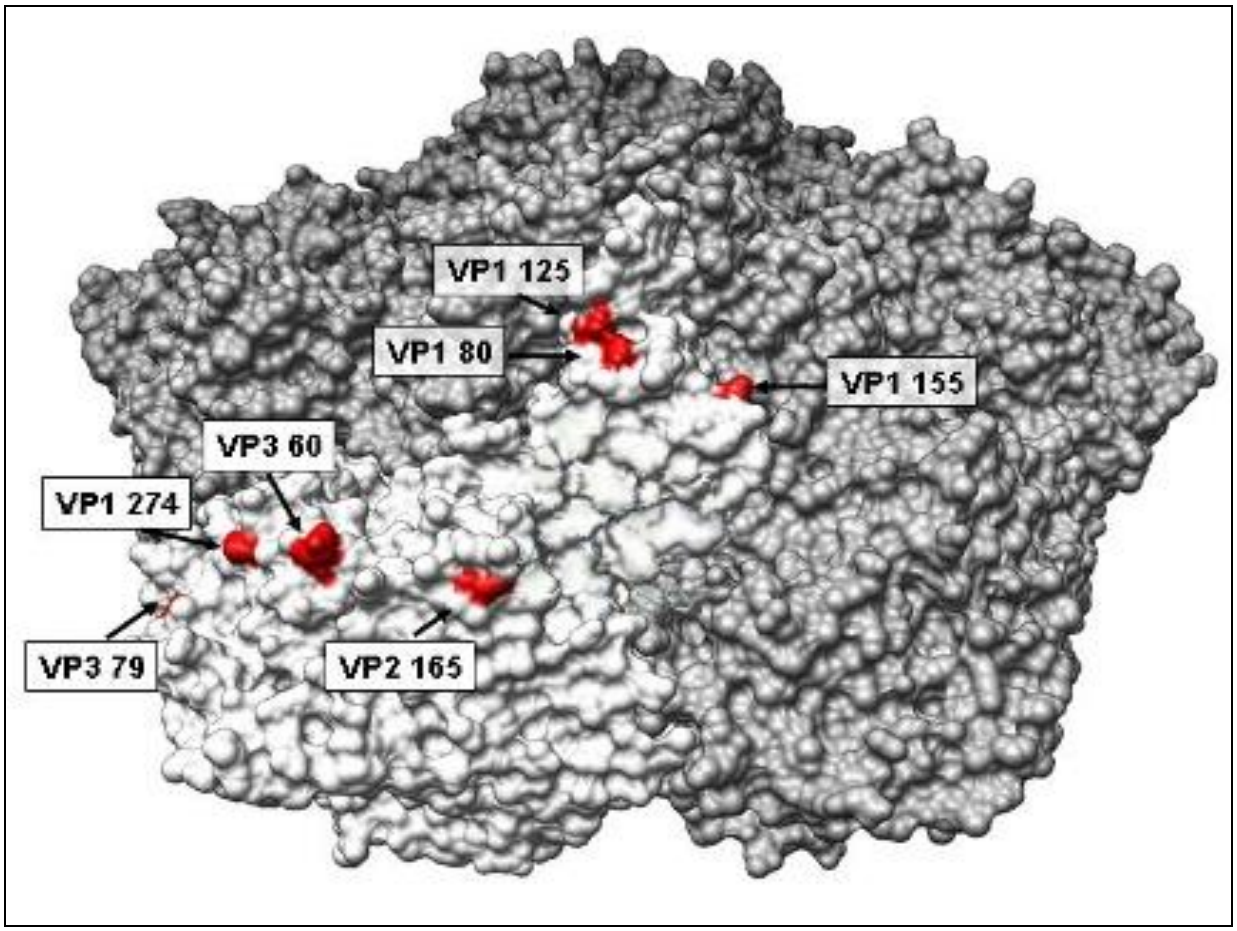


Figura 24. Ubicación de las mutaciones sobre un pentámero de CVB3 en el cual se han resaltado en rojo los aminoácidos correspondientes a las mutaciones entre CVB1N y 1Nm. De esta manera se evidencia la posición de aquellos residuos que se exponen a la superficie externa de la cápside.

De este análisis se observa que las posiciones aminoacídicas de interés mayoritariamente se ubican dispersas en diferentes bucles (*loops*) de la superficie externa de la cápside, y por este motivo se puede suponer que alguno de estos residuos pudieran estar implicados en el cambio del fenotipo entre CVB1N y CVB1Nm, debido al cambio en la afinidad por alguno de sus receptores putativos. No se puede descartar, sin embargo, la posibilidad de otros hipotéticos receptores implicados, o la alteración de otro mecanismo como la apertura de la cápside viral.

5.3 Predicción de interacción de mutaciones con el receptor viral usando estructuras virus-receptor obtenidas por Cryo-EM

Sumado al análisis de la posición de los restos aminoacídicos mutados entre CVB1N y CVB1Nm, se utilizó la estructura de CVB3 (cepa RD) con su receptor celular DAF, recientemente obtenida (Hafenstein, Bowman y col. 2007), así como la estructura virus-receptor del CVB3m con CAR (He, Chipman y col. 2001), ambas elucidadas por reconstrucción Cryo-EM, de las cuales se puede inferir la relación espacial entre los residuos de interés y los receptores virales.

Analizando las estructuras 3D de dichas reconstrucciones se puede observar que VP2 165, situado en el *puff*, yace directamente debajo del receptor DAF, interaccionando con este, ya que se observa en la reconstrucción Cryo-EM que ambas densidades electrónicas se superponen. También se puede ver que VP2 165 esta cercano a CAR, siendo este el único de los residuos de interés que muestra relación con este receptor (Figura 25). Otros residuos también están en la vecindad del área donde interactúa DAF (VP1 155, 274 y VP3 60) pero no se podría aseverar que interaccionen (Figura 25). El resto de los residuos no guardarían relación aparente con los receptores. En el caso de VP1 107, la inserción de leucina (L) debajo del *puff*, podría modificar la superficie externa de la cápside viral en esta región, alterando la interacción con el receptor. Además VP1 107, aún sin estar expuesto a la superficie, se encuentra formando el *pocket*, donde descansa el *pocket factor*, un ligando lipídico que estabilizaría el protómero y se sospecha es liberado luego de la interacción con CAR.

Para poder apreciar mejor estas relaciones se realizó la representación en un diagrama 2D de coordenadas angulares, utilizando el programa RIVEM, en el cual la proyección de los residuos aminoacídicos de la superficie de CVB3 se hallan representados a manera de piezas en un mosaico dentro de la subunidad asimétrica. Se han resaltado los residuos de interés en este diagrama (Figura 26) y marcado las huellas bidimensionales de los receptores elucidadas por Cryo-EM sobre la superficie viral, así como la densidad electrónica de DAF, que no es totalmente coincidente con su huella (Figura 26).

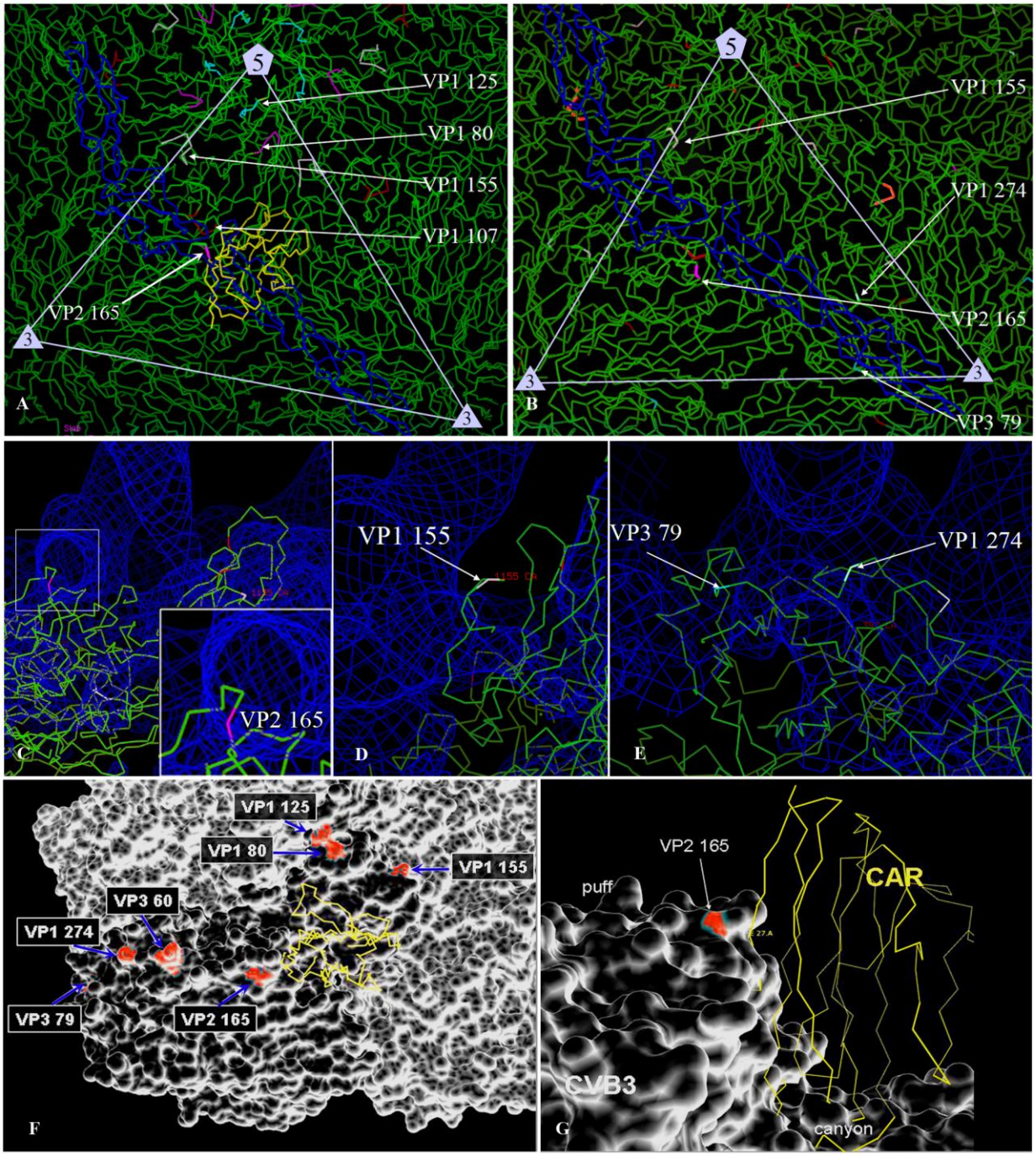


Figura 25. A partir de las reconstrucciones Cryo-EM 3D ya elucidadas para CVB3RD-DAF y CVB3-CAR, se evidencia la interacción de los diversos restos aminoacídicos de interés con los receptores virales CAR (amarillo) y DAF (azul). A: esquema de la subunidad asimétrica de CVB3 y los 2 receptores putativos CAR (dominio D1) y DAF (SCR1-4). Asimismo, se marcan las posiciones de los residuos VP1 80, 107, 125 y 155 y VP2 165. B: VP1 274, VP2 165 y VP3 79. A y B no son idénticas vistas de la reconstrucción por lo que se ha exagerado la diferencia en la posición del marco triangular de la subunidad asimétrica. C, D y E: vistas ampliadas de aquellos residuos cercanos a la densidad electrónica de DAF (representado como tejido de malla azul). En las mismas se puede apreciar que la densidad se encuentra claramente interaccionando con el residuo VP2 165, y cercano a VP1 155, 274 y VP3 79. F: vista de la superficie externa del pentámero donde se muestra el esqueleto Cα del dominio D1 de CAR y se marcan los residuos de interés. G: detalle de F mostrando la cercanía del residuo VP2 165 a CAR.

Tabla 7. Interacciones predichas de los receptores con los restos aminoacídicos mutados

CVB1N → CVB1Nm	Localización en la estructura referida a receptor
VP2 D→E, 165	Bajo la huella de DAF y CAR
VP3 N→T, 60	Vecindad de la huella de DAF
VP3 R→G, 79	Cercano a DAF. Debajo de la densidad electrónica de SCR 4.
VP1 N→T, 80	No se sospecha interacción
VP1 E→Q, 125	No se sospecha interacción
VP1 T→A, 155	Vecindad de la huella de DAF SCR 1-2
VP1 N→S, 274	Cercano a DAF. Debajo de la densidad electrónica de SCR 4

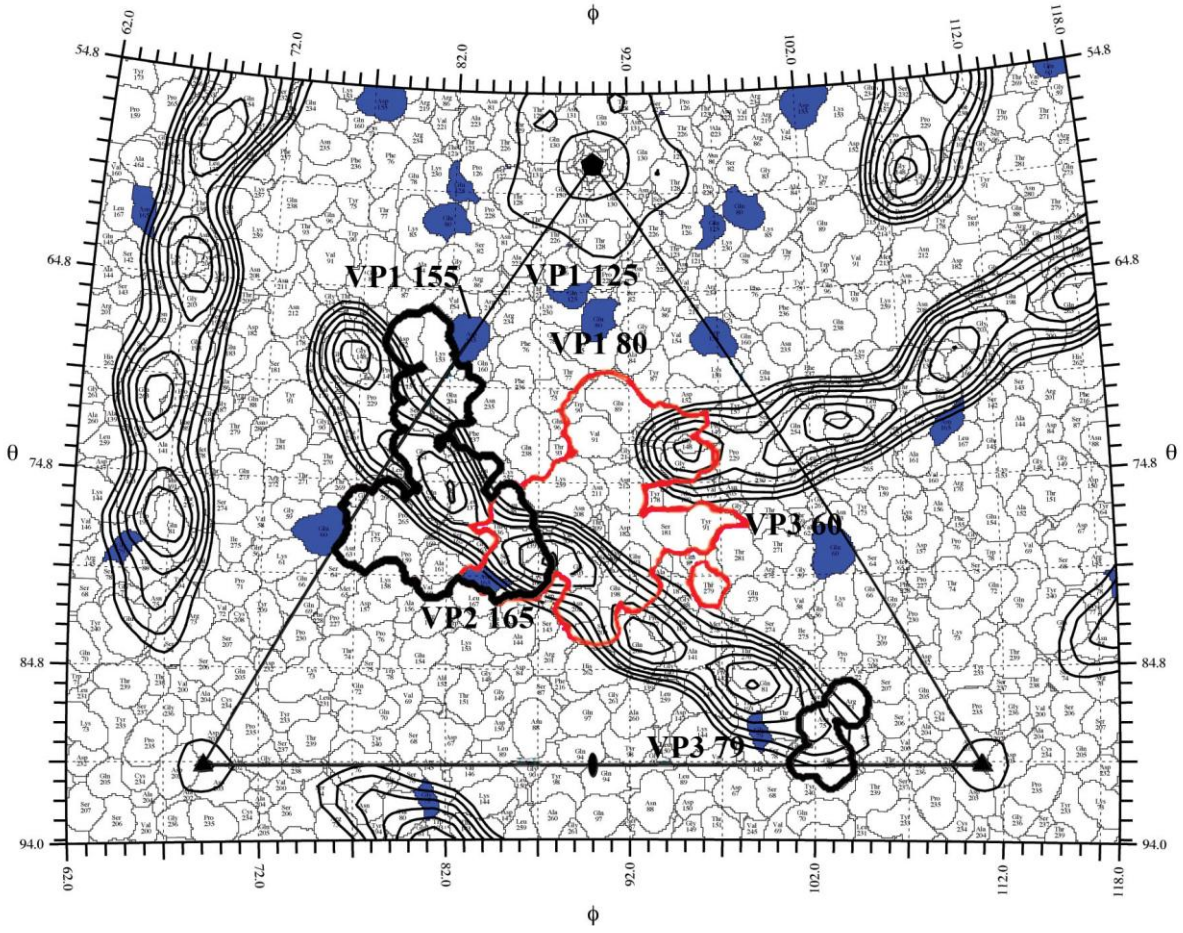


Figura 26. Diagrama 2D de coordenadas angulares, en el cual la proyección de los residuos aminoacídicos de CVB3 se hallan representados como piezas en un mosaico. En azul se resaltan aquellos residuos que corresponden a mutaciones entre CVB1N y Nm. En negro se observa la proyección sobre la superficie de la huella de DAF y su densidad electrónica y en rojo la huella de CAR, correspondientes a la interacción con CVB3 elucidada por reconstrucción Cryo-EM.

5.4 Discusión.

En el presente capítulo se aplicaron los modelos estructurales disponibles de CV, para mapear las diferencias aminoacídicas entre CVB1N y CVB1Nm. Previo a esto se busco validar la aproximación cotejando la secuencia de CVB1N contra el CVB3 ya cristalografiado por otros autores (Muckelbauer, Kremer y col. 1995), mostrando que la estructura está muy conservada en otros CVB (Fry, Knowles y col. 2003; Verdaguer, Jimenez-Clavero y col. 2003). Se observó del alineamiento de CVB1 que la mayoría de su secuencia es muy similar sobre los motivos conservados de la estructura secundaria entre los modelos. También usamos las estructuras de complejos virus-receptor ya elucidadas para CVB3 por Cryo-EM, con el fin de observar como se relacionan estos residuos con los sitios de unión de los receptores CAR y DAF.

Son diversos los mecanismos que podrían afectarse por las mutaciones en las proteínas de la cápside viral incluyendo la unión al receptor (Verdaguer, Jimenez-Clavero y col. 2003; Rezaikin, Novoselov y col. 2009) o la expulsión del genoma y el empaquetamiento (Kirkegaard 1990). Además, se ha sugerido que las proteínas de la región P1 pueden estar implicadas en el *switch* entre replicación y traducción (Johansen y Morrow 2000). También el ARN genómico puede cumplir un rol estructural en el ensamblaje de la partícula viral estabilizando la estructura (Schneemann 2006). Considerando que las diferencias en la secuencia fueron mínimas y que en los poliovirus la unión de proteínas virales (pentámeros) al ARN es independiente de la secuencia (Nugent y Kirkegaard 1995), es poco probable que estos mecanismos participen en el cambio de fenotipo de CVB1Nm.

La mutación en VP4 60, se halla en el interior de la cápside viral, no por lo que no tiene acceso a la interacción con los receptores. Otros autores han reportado ciertos residuos de esta proteína como candidatos a determinantes de patogenicidad (Ramsingh, Araki y col. 1992) aunque estudios posteriores determinaron que no es un determinante mayor de patogenicidad (Caggana, Chan y col. 1993), lo que explicaría que finalmente fuera catalogada como determinante menor (Ramsingh y Collins 1995).

VP2 165, está ubicado en el *puff* y en relación con ambos receptores, CAR y DAF. No sorprende entonces que en esta región otros autores han hallado determinantes moleculares de patogenicidad. Se ha descripto que el cambio K→R en el residuo VP2 158 lleva a la atenuación (Stadnick, Dan y col. 2004). El residuo VP2 165, ha sido descripto como un determinante mayor de patogenicidad, donde el cambio N→D lleva a la atenuación del fenotipo miocardítico (Knowlton, Jeon y col. 1996). También en CVB1Nm D→E se relacionó con el fenotipo patogénico. Es sugestivo que en ambos casos el residuo aspartato (D) esté ligado al fenotipo

atenuado. Lo que refuerza a esta posición como importante determinante de patogenicidad potencial.

Por otro lado, VP3 60 se halla en otro motivo estructural importante, el *beta knob*, que presenta una alta variabilidad y está en la vecindad de la huella de DAF. En esta región también se han hallado determinantes moleculares de patogenicidad: la transición E→G se asoció con atenuación del carácter miocardítico y parcialmente del pancreatítico (Stadnick, Dan y col. 2004). En nuestro caso, el cambio N→T podría estar implicado en el aumento de patogenicidad, por lo que también se postula como determinante molecular de patogenicidad. Los cambios VP3 79 R→G, dentro de un *loop* y debajo de la densidad electrónica de DAF en la reconstrucción Cryo-EM, al igual que VP1 274 que se halla cercano a la huella de DAF, poseen un rol incierto ya que no hay reportes específicos en la literatura.

Los cambios N→T, en VP1 80, y E→Q, en VP1 125 no se hallan cercanos a la interacción con ninguno de los receptores dificultando la asignación de un mecanismo en el cual pudiesen estar involucrados. Por otro lado, no hay información específica de estos residuos en la bibliografía, aunque en las vecindad VP1 129 ha sido descripto como determinante mayor de patogenicidad (Caggana, Chan y col. 1993).

El cambio en VP1 155 (T→A) se halla cercano a la huella de DAF pudiendo tambien estar involucrado en la interacción con este receptor. Se ha descripto que el cambio en esta posición N→G lleva a la atenuación miocardítica (Cameron-Wilson, Pandolfino y col. 1998) mientras que en esta posición D→E lleva a atenuación solo del fenotipo miocardítico pero no posee efecto en el carácter pancreatítico (Dan y Chantler 2005). También se ha encontrado que en VP1 145 del echovirus 71se halla un determinantes molecular de patogenicidad en el intento de adaptación al modelo murino (Chua, Phuektes y col. 2008).

El residuo L en VP1 107 es frecuentemente hallado, como se observó en los alineamientos. Este residuo se ubica formando parte del *pocket* lo que podría indicar que tenga un rol en las interacciones que estabilizan la partícula viral (Muckelbauer, Kremer y col. 1995), y por ende podría afectar al fenotipo.

En resumen, varias de las mutaciones encontradas en CVB1Nm podrían estar relacionadas con la interacción virus-receptor. En el siguiente capítulo, se describen los experimentos realizados al respecto.

Capítulo 6. Evaluación del papel de los receptores virales en el cambio de fenotipo de CVB1Nm

Con el objeto de poner en evidencia mecanismos relacionados con los receptores virales se procedió a realizar un conjunto de experiencias *in vitro, ex vivo* e *in vivo*, para averiguar si existen diferencias entre CVB1N y CVB1Nm con respecto al uso y afinidad de estas variantes por CAR y/o DAF. A tal fin, se mostraran ensayos de reducción de placa, hemaglutinacion, y el comportamiento de ambas variantes en ratones Daf-1 *knock out* (KO).

6.1 Ensayo de reducción de placa en células HeLa con receptores virales solubles

La reducción en la formación de placas se ensayó preincubando CVB1N, CVB1Nm y CVB3 (como control), con CAR o DAF solubles. En el caso de CAR se pudo observar una reducción mayor al 99% con ambos virus (Tabla 8). Cuando se empleó DAF, se pudo observar una reducción del 10-50% para CVB1Nm y de 90% para CVB1N (Tabla 8).

Tabla 8. Reducción de placa con los receptores solubles, expresados en porcentajes de reducción.

	Virus preincubado con CAR	Virus preincubado con DAF
CVB1N	99%	90%
CVB1Nm	99%	10-50%

6.2 Propiedades patogénicas de las variantes parentales en ratones C57BL/6J y C57BL/6J Daf-1 Knock Out.

Para aclarar la función de la molécula murina Daf-1 en la infección, ratones C57BL/6J (WT) y Daf -/- KO de 21 días de edad fueron inoculados ip con CVB1N y CVB1Nm, para estudiar su histopatología a los 10 dpi.

CVB1N indujo escasa pancreatitis en ratones WT, (Figura 27 A) y una pancreatitis levemente mayor en los KO (Figura 27 E). Del mismo modo, CVB1Nm también indujo una mayor injuria pancreática en los animales KO (Figura 27 G), siendo también mayor a la observada en los ratones WT (Figura 27). Con respecto al miocardio, se observó ausencia de lesiones en los ratones WT con ambos virus (Figura 27 B y D). En ratones KO, se observaron mínimas lesiones en los animales inoculados con CVB1N y una moderada miocarditis en los inoculados con CVB1Nm (Figura 27 F y H, respectivamente). El *score* patogénico se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Score patogénico de las poblaciones KO y WT inoculados con CVB1N y 1Nm.

	Score patogénico en WT		Score patogénico KO	
Virus	Pancreatitis	Miocarditis	Pancreatitis	Miocarditis
CVB1N	0,8 ± 0,2	0	1,2 ± 0,4	0,2 ± 0,1
CVB1Nm	2,6 ± 0,8	0	3,6 ± 0,8	1,2 ± 0,6

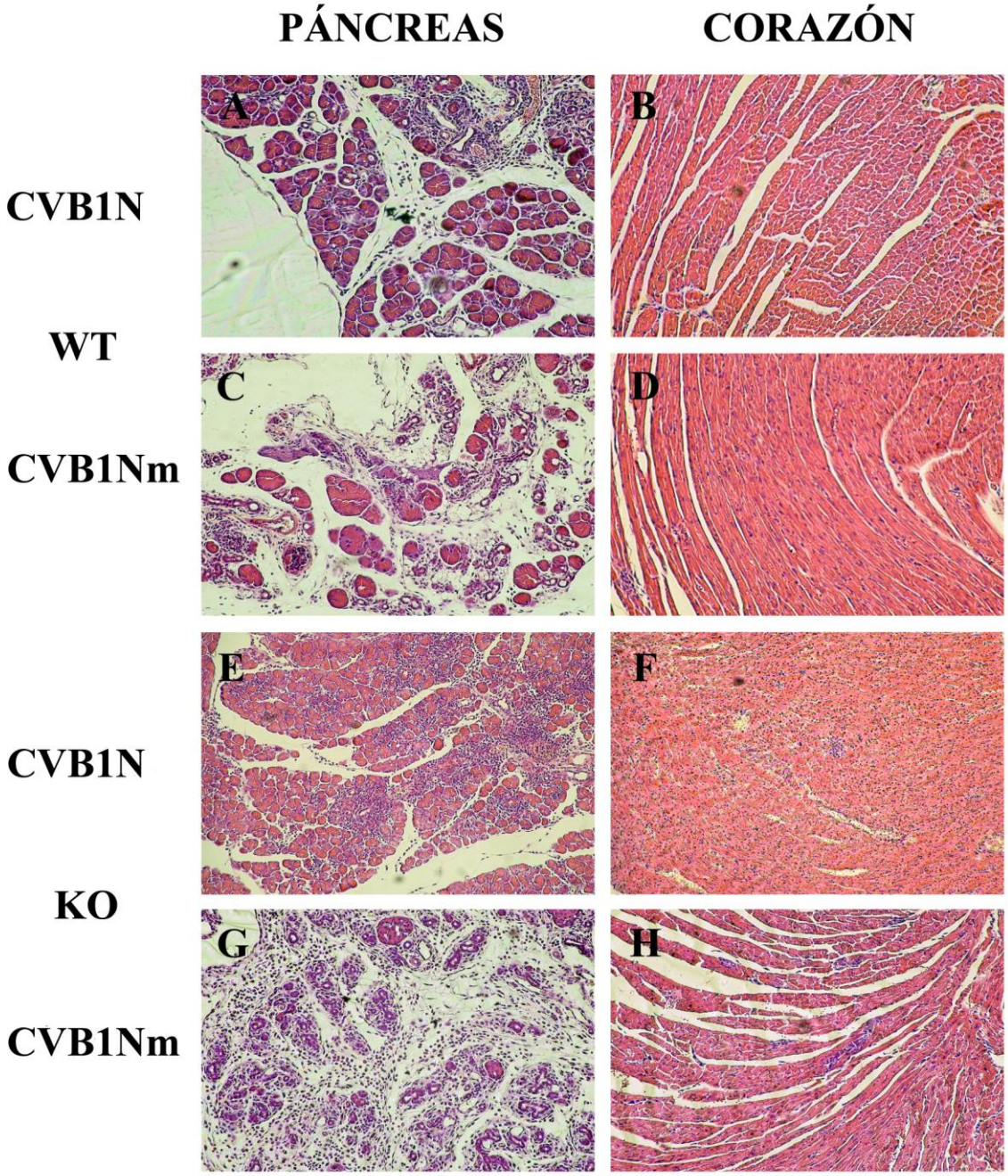


Figura 27. Histología de páncreas y corazón de ratones machos de 21 días C57BL/6J fenotipo salvaje (WT) y Daf-1 (KO) con CVB1N y CVB1Nm. A los 10 dpi el páncreas y el corazón fueron cosechados y procesados de rutina para HyE. Se muestran secciones representativas del páncreas y miocardio.

En conjunto estos resultados sugieren que los ratones C57BL/6J son menos susceptibles que los ratones C3H/HeJ. Por otro lado los ratones C57BL/6J Daf-1 -/- mostraron una mayor susceptibilidad a la pancreatitis y a la miocarditis, al compararse con su contraparte C57BL/6J salvaje.

6.3 Hemaglutinación por variantes parentales de eritrocitos humanos y de ratón.

Eritrocitos humanos O Rh(-) y provenientes de ratones Balb/c se incubaron separadamente con CVB1N, CVB1Nm y una cepa con propiedades conocidas de hemaglutinación (CVB5 Faulkner), utilizada como control positivo. Los resultados mostraron que tanto CVB1N como CVB5 aglutinaron eritrocitos humanos. En contraste no se observó hemaglutinación con CVB1Nm. En ningún caso los virus ensayados aglutinaron eritrocitos murinos.

Tabla 10. Aglutinación de glóbulos rojos humanos y murinos por CVB1N y 1Nm.

Hemoaglutinación	Eritrocitos Humanos O Rh(-)	Eritrocitos murinos Balb/c
CVB1N	+	-
CVB1Nm	-	-
CVB5	+	-
PBS	-	-

6.4 Carga viral en miocardio en ratones WT y KO

Se intento medir diferencias en el nivel de ARN viral en tejido cardíaco a los10 dpi, entre ratones C57BL/6J WT y KO por RTqPCR. La misma arrojó resultados negativos para todos los grupos de animales, concluyendose que el ARN viral llega a niveles no detectables en corazón en ambos grupos de animales a los 10 dpi.

6.5 Evaluación de la expresión de CAR en corazón de ratones C57BL/6J.

Con el fin de elucidar si los ratones C57BL/6J WT y KO poseen igual nivel de expresión de la molécula receptora CAR, se procedió a su medida por RT-qPCR normalizando la expresión con respecto a actina. Los resultados obtenidos a partir de esta medida muestran que en todos los casos el nivel de expresión de CAR es el mismo en ratones KO y WT.

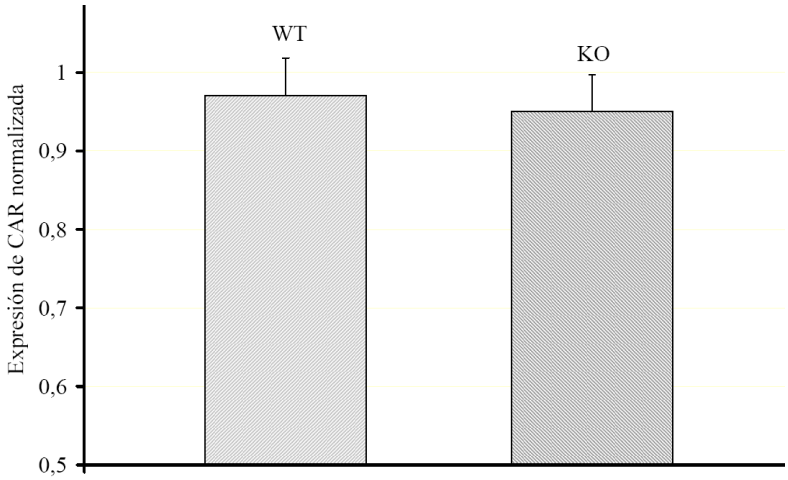


Figura 28. Grafico de barras en el que se observa que no existen diferencias significativas en el nivel de expresión de CAR. En el eje de la ordenada se grafica el cociente entre los valores de CAR normalizados con actina.

6.6 Valoración de la viremia temprana entre ratones C57BL/6J WT y KO

Se evaluaron las viremias en ratones C57BL/6J WT y KO de 21 días de edad, con el objetivo de caracterizar en periodos tempranos la infección por CVB1N y 1Nm en ambos modelos. Para ello se procedió a medir por RT-qPCR el número de copias de ADNc obtenido a a las 12 y 24 horas pos-inoculación. Se pudo apreciar que la viremia a las 12 hs no es distinta en los diferentes grupos de animales. A las 24 hs aunque se detectó un aumento en la viremia en todos los grupos, no se detectaron diferencias significativas ya que la dispersión en los valores fueron muy grandes. De este ensayo podemos concluir que ambas variantes replican a tiempos tempranos tanto en animales KO como WT (Figura 29). Para precisar los niveles de viremia deberán incluirse mayor número de animales.

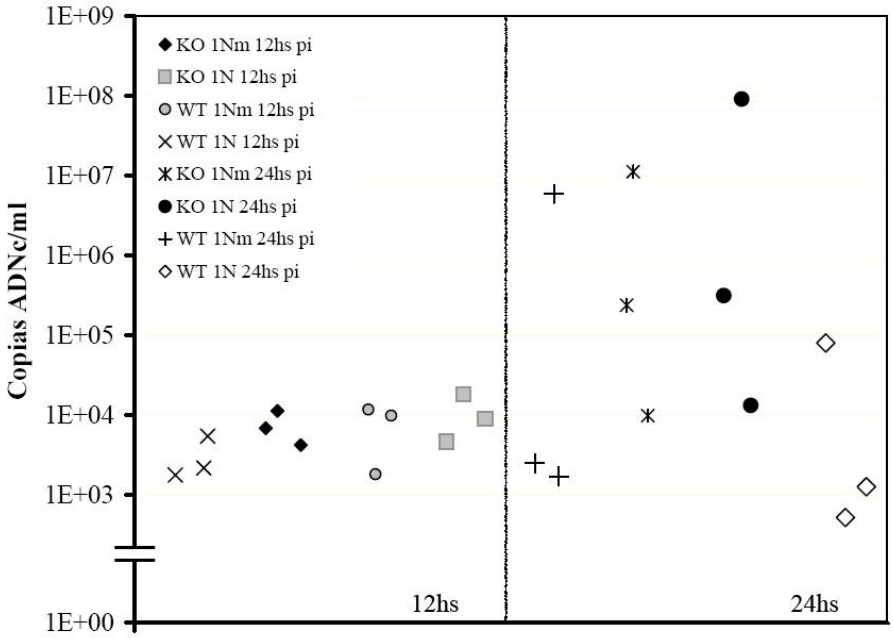


Figura 29. Carga viral detectada por RT-qPCR en sangre extraída a las 12 y 24 horas pi. Cada punto representa un individuo KO o WT de 21 días infectado con CVB1N o CVB1Nm

6.7 Discusión de resultados

Se realizaron un conjunto de experimentos con el objetivo de estudiar la interacción de los CVB1 con los receptores putativos CAR y DAF.

En los ensayos de reducción de placa, cuando se utilizó CAR ambos virus mostraron una reducción del 99%. En cambio, cuando se utilizó DAF, CVB1N fue reducido en al menos 1 Log, mientras que CBV1Nm mostró menor interacción con el receptor.

Con la evidencia de que nuestros virus mostraban una diferencia en la afinidad por DAF, se dispuso realizar experimentos *in vivo* utilizando ratones KO (Sun, Funk y col. 1999). Como estos animales eran C57BL/6J, se utilizaron controles pareados de dicha cepa. Cabe señalar que estos animales se han descripto más resistentes al desarrollo de miocarditis (Esfandiarei y McManus 2008), lo que fue corroborado en nuestros estudios. Además, no observamos no existiría presencia del genoma viral en corazón a los 10 dpi, indicando que el *clearance* del virus fue eficaz.

Aunque existen reportes que indican que los CVs no utilizan el homólogo murino Daf-1 (Spiller, Goodfellow y col. 2000), se consideró razonable hacer estos experimentos para verificar el uso de este posible receptor *in vivo*, ya que CVB1Nm es un virus obtenido del pasaje en ratón SCID, y virulento en C3H/HeJ, lo que indica la adaptación al modelo murino. Además, varias de las mutaciones mapean en la región de la huella del receptor DAF. Asimismo, Daf-1 cumple la misma función que su homólogo DAF, uniendo moléculas similares, y posee una estructura similar (Miwa y Song 2001), y aunque la similitud entre las secuencias de DAF y Daf-1 es solo del 50%, sus secuencias aminoacídicas se hallan altamente conservadas en zonas de la región extracelular del SCR 2 y 3 que precisamente son las que interaccionan con los CVB (Hafenstein, Bowman y col. 2007). Fue por ello que verificamos también que la expresión de CAR es igual en el corazón KO y WT a fin de poder interpretar que las diferencias observadas en los estudios de estos modelos solo son debidas a Daf-1.

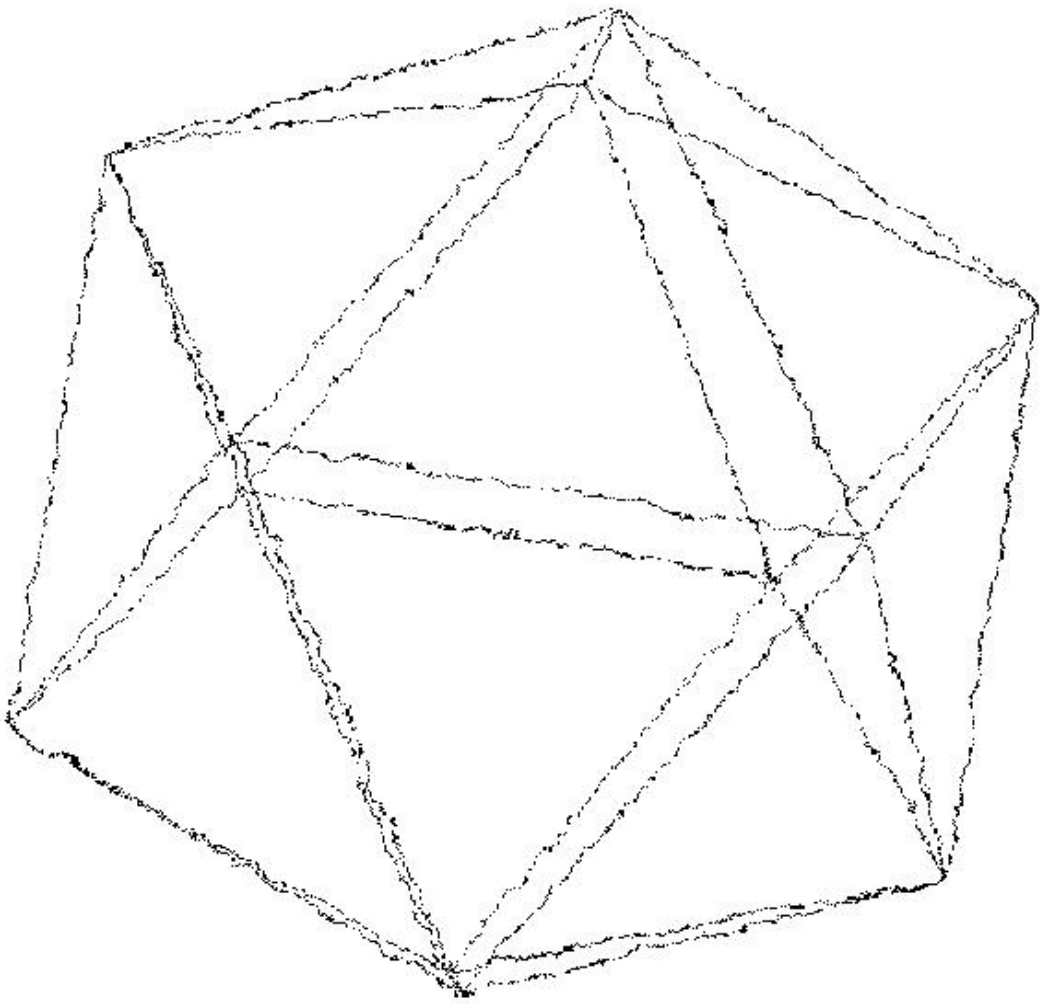
Los resultados de la histopatología mostraron, como se esperaba, que CVB1N fue menos patogénico que CVB1Nm en la cepa murina C57BL/6J. Si se considera que la presencia de Daf-1 aumenta el tropismo de un virus adaptado a unir esta molécula, los niveles de injuria en el ratón WT se esperarían mayores que en el ratón KO. Sin embargo, esto no se observó. La explicación a la mayor injuria observada en los ratones KO por la infección viral, respecto de un control WT, puede encontrarse en la respuesta inmune exacerbada que presentan estos animales (Miwa y Song 2001) y a la ausencia de un rol como receptor viral de Daf-1.

Se acepta que los virus que unen DAF poseen actividad hemaglutinante (Williams, Chaudhry y col. 2004) y por esta razón realizamos ese ensayo. Como resultado del mismo

observamos que mientras CVB1N aglutina glóbulos rojos humanos, CVB1Nm no lo hace, interpretándose una perdida en la afinidad por DAF, en soporte de los resultados obtenidos en los ensayos de reducción de placa. En cambio los eritrocitos de ratón no fueron aglutinados con ninguno de los virus empleados, lo que sugiere, junto con los resultados obtenidos *in vivo*, que el homólogo Daf-1 no es receptor de CVB1.

En resumen ambos virus, CVB1N y CVB1Nm, se unen a los receptores CAR y DAF, pero en el caso de este último la reducción de formación de placas de CVB1Nm parece evidenciar una pérdida de afinidad por este receptor, hecho también observado en los ensayos hemaglutinación de eritrocitos humanos. Finalmente, el homólogo murino Daf-1 parece no jugar un rol como receptor viral. Más estudios serán necesarios para clarificar el papel de los receptores murinos en la patogénesis.

Discusión final, conclusiones y perspectivas



En el presente trabajo, se ahondó en el estudio de las diferencias entre las variantes intratípicas CVB1N y CVB1Nm con respecto a sus diferencias genómicas, replicativas *ex vivo*, *in vivo*, estructurales y en el uso de los receptores celulares.

Observando alineamientos con otros enterovirus, resultó notorio que de los nts mutados encontrados en el 5'UTR de CVB1Nm, sean más frecuentes que los presentes en CVB1N. Los motivos de este cambio son desconocidos pero es posible que CVB1N, que originalmente fue aislado de una muestra clínica (Rinehart, Gomez y col. 1997), haya sido posteriormente adaptado a cultivos celulares por repetidos pasajes previos a su clonación. De ser este el caso, los cambios en los nts de esas posiciones se relacionarían con las caraterísticas atenuadas de CVB1N.

Nuestros estudios demostraron que la presencia del 5'UTR de CVB1Nm lleva a un aumento de la replicación y la citotoxicidad en células HeLa, en concordancia con lo observado por otros autores con otros mutantes del 5'UTR de CVB1N (Zhong, Li y col. 2008). El estudio del fenotipo de placa estuvo dirigido a intentar relacionarlo con las regiones genómicas mutadas y con la virulencia, a fin de correlacionar luego éstos parámetros con el carácter patogénico *in vivo* de estas variantes, como otros autores han realizado (Jimes y Jamison 1983; Zhang, Yousef y col. 1994). En nuestros estudios, hemos observado que el cambio en el fenotipo de placa se debe a determinantes en el 5'UTR. Similares resultados obtuvieron otros autores en CVB1 (Zhong, Li y col. 2008). Sin embargo, estudios en CVB3 han mostrado falta de correlación entre el fenotipo de placa y determinantes de patogenicidad, relacionándolo con la región P1 (Ramsingh y Collins 1995; Zhang, Blake y col. 1995). Estas diferencias con nuestros resultados podrían explicarse por la utilización de otros serotipos o cultivos celulares.

Ha sido reportado que cambios en la región 5'UTR pueden llevar a un cambio en las propiedades patogénicas en la infección por CVB (Chapman, Ramsingh y col. 1997; Tracy y Gauntt 2008), y en particular en CVB1N (Zhong, Li y col. 2008). Además, 2 de los cambios que se encontraron en el 5'UTR se hallaron en SLII, una región genómica determinante de cardiopatogenicidad en el caso de CVB3 (Dunn, Bradrick y col. 2003; Stadnick, Dan y col. 2004), y de la virulencia en ratones recién nacidos infectados con CVB1 (Rinehart, Gomez y col. 1997). Se sabe de al menos 2 proteínas de unión al ARN celular que interactúan con el SLII de PV1. Una es el factor de traducción EIF-2α que interactúa con las regiones que comprenden los nts 97-182 y 510-629 (del Angel, Papavassiliou y col. 1989), mientras que la proteína de unión a polipirimidina interactúa con las regiones que comprenden nts 70-288, 443-539 y 630-730 (Hellen, Pestova y col. 1994). Las mutaciones en el SLII de CVB1Nm podrían influir en la eficiencia de la replicación viral en un tipo celular específico afectando el mecanismo de

traducción del ARN viral y/o la síntesis. Estos factores podrían ser determinantes de virulencia en la patogénesis, secundarios a eventos anteriores en el proceso infeccioso tales como la interacción virus receptor (Ishii, Shiroki y col. 1998; Ishii, Shiroki y col. 1999; Sonenberg y Dever 2003). Sin embargo, en nuestros estudios estos hallazgos no correlacionan con la patogenicidad evidenciada *in vivo* en ratones C3H/HeJ, lo que sugiere que las variaciones en el 5'UTR de CVB1Nm no son suficientes para explicar el fenotipo pancreatítico y/o miocardítico.

Aunque varios estudios han caracterizado determinantes moleculares de la enfermedad tras la infección con un número de variantes intra o intertípicas de CVBs, hay relativamente pocos estudios que comparan los determinantes moleculares de la enfermedad para diversos órganos con el mismo virus. En el caso de virus recombinantes de CAV9 y CVB3, el tropismo por el páncreas e hígado en ratones recién nacidos se demostró que mapea en la región de genes estructurales P1 (Harvala, Kalimo y col. 2002). Un enfoque similar en ratones adultos, demostró que la región P1, de CVB3, determina el tropismo hacia el tejido hepático como resultado del reconocimiento de los receptores, y que el 5'UTR de CVB3 potencia la multiplicación del virus en el páncreas de ratón (Harvala, Kalimo y col. 2005). En otro estudio (Stadnick, Dan y col. 2004) se han caracterizado una serie de mutantes, de una cepa miocardítica de CVB3 (Kandolf y Hofschneider 1985), que escapan a la neutralización de anticuerpos, y que causaron enfermedad cardíaca y pancreática en ratones.

El análisis histopatológico de los diferentes virus muestra que varios virus recombinantes fueron patógenos para el páncreas, y sólo unos pocos indujeron miocarditis, pero ningún virus indujo miocarditis en ausencia de pancreatitis, resultado que fue observado en otros estudios con CVBs (Tracy, Hofling y col. 2000). Además, se observó que la histopatología correlaciona con el título viral en homogenatos de dichos tejidos. Puede relacionarse que aquellos virus que son cardiovirulentos son los que lograron más altos títulos en el páncreas, mientras que ciertos virus que lograron títulos intermedios en páncreas fueron significativamente menos miocardíticos y generaron un nivel intermedio de pancreatitis. Sería posible que exista un valor de corte mínimo en la carga viral exhibida por el páncreas, para que la infección sea patogénica al corazón. Si este fuera el caso, los virus cardiovirulentos poseerían determinantes que lleven a alto título en el páncreas. Al respecto, se ha descripto que la inoculación intraperitoneal de ratones jóvenes Balb/c con CVB3m se asoció a un inicio de la replicación del virus en páncreas seguido por una pancreatitis necrotizante (Gomez, Lascano y col. 1991), y también se ha propuesto al páncreas como el principal sitio de replicación viral, y precede a la miocarditis cuando se inoculan ratones ip (Gomez, Lascano y col. 1991). Alternativamente, puede que haya más de un factor determinante de patogenicidad del virus que al ser excluido en la construcción de algunos virus

recombinantes conduzca a cambios dramáticos de atenuación de la miocarditis con una pequeña reducción de la pancreatitis. Similares resultados fueron reportados por otros autores (Tracy, Hofling y col. 2000) cuando estudiando las propiedades patogénicas para el páncreas y el corazón de 9 CVB3 genotípicamente diferentes, así como CVB1, CVB2, CVB4 y CVB6, en ratones jóvenes de las cepas C3H/HeJ y A/J, se observó que aunque casi todos los CVBs analizados replicaron e indujeron cierto grado de patología en el páncreas, y solo algunos de ellos pudieron inducir miocarditis, siendo siempre precedida por, o concomitante con pancreatitis, pero nunca lo contrario. En resumen, podría ser que para que suceda miocarditis, primero debería haber altos títulos en páncreas y/o que los determinantes de pancreatitis y miocarditis son distintos y no están relacionados, como parecerían indicar nuestros resultados.

En estudios con virus CVB3 que escapan a la neutralización de anticuerpos (Stadnick, Dan y col. 2004) se encontró que un cambio E→G en la posición VP3 60 condujo a la atenuación del virus con respecto a la miocarditis, pero con reducción parcial de la pancreatitis. En el caso de VP2 165 ha sido descripto como un determinante mayor de patogenicidad, donde el cambio N→D lleva a la atenuación del fenotipo miocardítico (Knowlton, Jeon y col. 1996), mientras que en CVB1Nm, D→E se relacionó con el fenotipo patogénico. Que el residuo aspartato (D) este ligado al fenotipo atenuado en ambos casos es sugestivo. En el residuo VP1 155 (T→A) se ha descripto que el cambio N→G lleva a la atenuación (Cameron-Wilson, Pandolfino y col. 1998) mientras que en esta posición D→E lleva a atenuación solo del fenotipo miocardítico pero no posee efecto en el carácter pancreatítico (Dan y Chantler 2005). A este respecto, es sugestivo que las mutaciones que hemos descripto en CVB1 comprenden cambios en estas mismas regiones y nuestras variantes presentan cambios al fenotipo patogénico, correlacionando con subregiones "calientes" del genoma, en las cuales la tasa de mutación es elevada, y por lo tanto poco conservada. Esto se pone en evidencia particularmente en el caso de VP3 60 y VP2 165. Como ya ha sido descripto por otros autores (Muckelbauer, Kremer y col. 1995), ciertas posiciones que se encuentran en zona de *loops*, pueden aceptar con mayor libertad fluctuaciones en la secuencia aminoacídica. Extrapolando los datos de la interacción DAF-EV7, se ha sugerido que las mutaciones en P1 afectan a CVB3 mutantes en la interacción con DAF en estudios de un virus originalmente patogénico cuyos mutantes resultaron atenuados en el modelo murino (Stadnick, Dan y col. 2004). Por el contrario, nuestro estudio se inició con una variante no patógena de CVB1, que por adaptación en ratones SCID adquirió *status* patogénico. Teniendo en cuenta el diferente enfoque, es sugerente que en ambos estudios se encuentran mutaciones similares en zonas del genoma que parecen afectar más la pancreatitis que la miocarditis en el modelo murino. Por ende, la existencia de estos "puntos calientes" en el genoma del patógeno

influyen en el fenotipo de CV independientemente si el virus es un mutante que escapa a anticuerpo, adaptado a cultivos celulares, o una variante adaptada al ratón. La inserción de 1 aminoácido presente en la proteína VP1 de CVB1Nm merece una mención especial, ya que no está relacionada con las huellas de CAR y DAF, pero se encuentra entre una hélice alfa y una hoja beta (Muckelbauer, Kremer y col. 1995) adyacente al *pocket* y por debajo del cañón. La inserción de aminoácidos puede alterar la estructura local. Esto es particularmente interesante teniendo en cuenta que se ha sugerido en rhinovirus que esta cavidad que aloja al *pocket factor* es de una importancia crucial para la dinámica de la cápside, y que es, a su vez, esta dinámica influye en la infección (Katpally y Smith 2007).

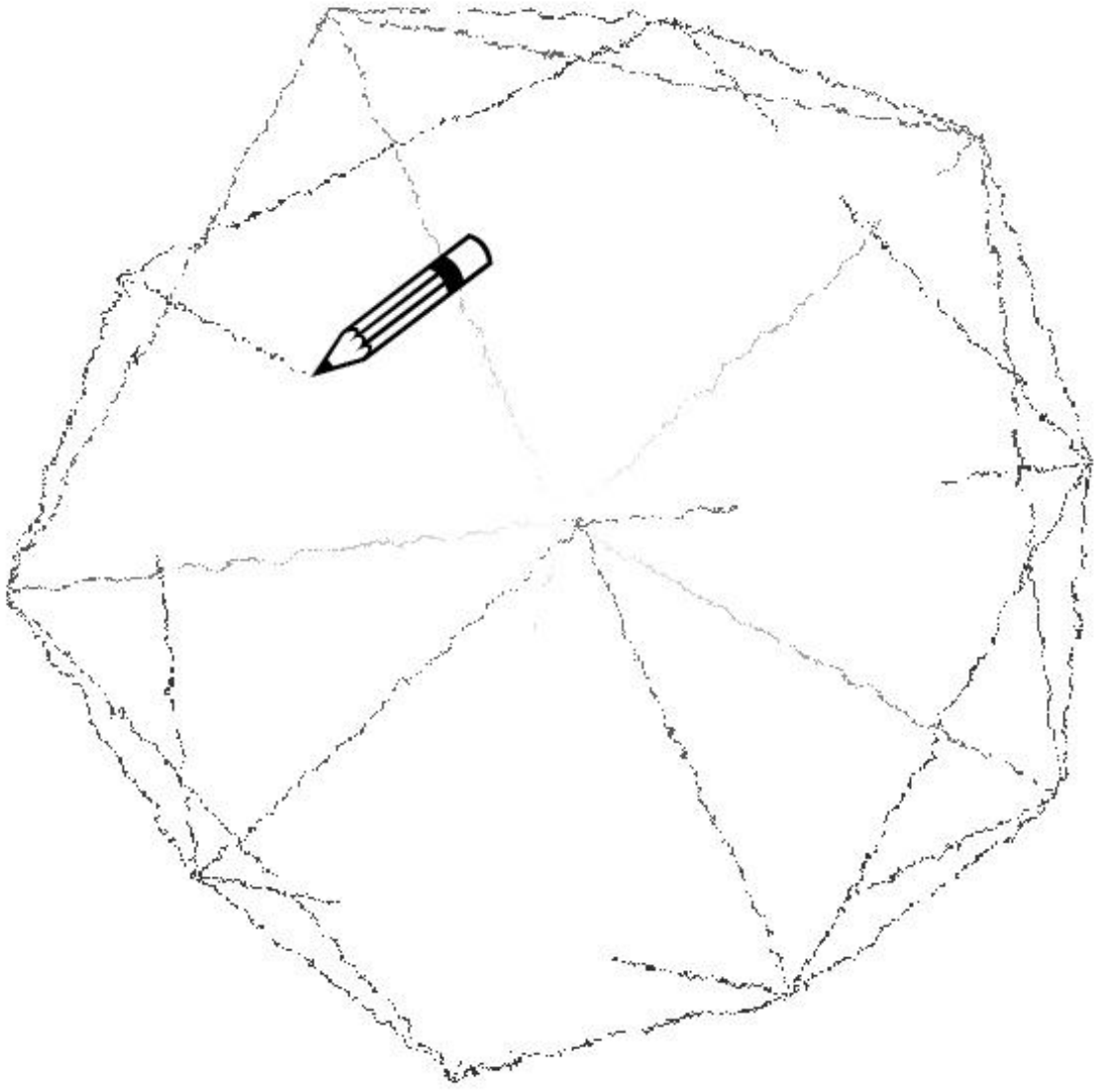
El hecho que la mayoría de las mutaciones mapean en el sitio de unión de DAF en lugar del de CAR, es particularmente relevante. Aunque todos los virus CVB utilizan CAR para iniciar una infección productiva, la afinidad por el co-receptor DAF parece ser más variable (Shieh y Bergelson 2002). Por otro lado, se ha descrito anteriormente que los CVB que usan DAF humano como receptor no utilizan el análogo murino de Daf-1 (Spiller, Goodfellow y col. 2000). En este sentido, nuestros resultados mostraron que CAR soluble redujo más significativamente que DAF ambos virus, CVB1N y CVB1Nm, como se esperaba. En cambio DAF redujo CVB1N más que a CVB1Nm. Significativamente, se observó también que CVB1N aglutina los glóbulos rojos humanos pero ningún CVB hemaglutinó glóbulos rojos murinos. La mayor injuria observada en la histopatología de ratones KO Daf-1, en comparación con sus controles e independientemente del virus usado, podría explicarse por el aumento de la respuesta inmune observada en estos animales (Liu, Miwa y col. 2005) y no por diferencias de afinidad por los virus a esta molécula. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que todas las variantes de CVB1 usan CAR, ninguna usa Daf-1, y que las mutaciones en CVB1Nm reducen la afinidad por el receptor DAF. Sin embargo, no se puede descartar que los virus interactúen de forma diferente con el receptor murino CAR y/o con otro receptor murino no identificado, una posibilidad ya sugerida por otros (Orthopoulos, Triantafilou y col. 2004)

Como conclusión, hemos realizado una serie de experimentos con el fin de identificar los determinantes moleculares de la enfermedad de CVB1 en el modelo murino. Aunque el 5'UTR, y en particular el SLII, puede desempeñar un papel, nuestros resultados implican a P1 como región importante en la patogenicidad. Por otra parte, los cambios de residuos mapean en regiones críticas para la unión a DAF en la superficie vírica, y aunque la molécula Daf-1 no parece desempeñar un papel de receptor, no se puede excluir que otros posibles receptores no identificados puedan ser utilizados o que lleven a cambios en la interacción con CAR.

Por otro lado el subconjunto de mutaciones del 5'UTR, VP4 60 y VP2 165, presentes en C69-1847, como el subconjunto de mutaciones en VP2 165 y de VP3, presentes en C932-2288 fueron suficientes para obtener un fenotipo pancreatítico significativo. Sin embargo, en nuestros virus recombinantes fueron necesarias todas las mutaciones de la región P1 para obtener el fenotipo miocardítico de CVB1Nm, sugiriendo que los determinantes para pancreatitis y miocarditis son distintos o se solapan solo parcialmente entre si.

Como perspectivas a futuro quedan por confirmar cada uno de los determinantes moleculares de patogenicidad encontrados utilizando mutagénesis dirigida. Otro desafío consistirá en obtener la estructura cristalográfica y estudiar los complejos virus receptor con nuestros virus. Algunos esfuerzos ya han sido dirigidos en este sentido.

Materiales y Métodos



Líneas celulares

La línea celular HeLa fue obtenida del Banco Argentino de Células (ABAC). La línea derivada de sarcoma de músculo esquelético RD fue gentilmente cedida por el Dr. M. Rossmann, Purdue University, USA. Todas fueron mantenidas en medio esencial mínimo (MEM) (Invitrogen) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB), y 2mm L- glutamina, 25.5 mM de bicarbonato de sodio, y 50 µg/ml de gentamicina. Cuando fue necesario, estas líneas celulares fueron mantenidas como stock congelado a -140°C, en el medio descrito anteriormente, con el agregado de 10% de DMSO.

Tranfección de ARN viral

Se utilizó un procedimiento ya descripto (Rinehart, Gomez y col. 1997). Brevemente, células HeLa en placas de 35mm, a un 80% de confluencia, fueron tratadas con una solución conteniendo DEAE-dextrano (1mg/ml) y ARN viral (obtenido por trascripción *in vitro*) durante 45 min. a 20°C, luego lavadas 3 veces con PBS pH 7,4, y luego incubadas con MEM 10% hasta la aparición de efecto citopático a las 24-48 hs. en estufa gaseada con 5% CO_2 a 37°C.

Virus

El origen de CVB1N y CVB1Nm fue descripto en Introducción. Los serotipos CVB5 y CVB3 y fueron obtenidos del Centro de Control de Enfermedades (CDC, USA). La variante RD de CVB3 fue gentilmente cedida por el Dr M Rossmann. En todos los casos, se prepararon *stocks* en células HeLa y alícuotas de los mismos fueron tituladas por ensayo de formación de placas y mantenidas en -140 °C hasta su uso.

Ensayo de formación de placas

Se utilizó un procedimiento ya descripto (Gomez, Lascano y col. 1991). Brevemente, monocapas de células HeLa a un 80% de confluencia fueron infectadas con diversas diluciones de virus e incubadas 1 h a 37°C. Luego, fueron lavadas en PBS e incubadas por 24-48 hs en una solución 1:1 compuesta por MEM 2X suplementado con 4% de SFB y 1.6% de metil celulosa. Luego, las células son fijadas y teñidas con una solución etanolica de cristal violeta al 1%. Las placas fueron contadas y expresadas como unidades formadoras de placas UFP/ml.

Curva de crecimiento viral de un paso

Las curvas de crecimiento viral de un paso fueron realizadas en células HeLa con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 virus/célula para cada virus, según se ha descrito anteriormente (Rinehart, Gomez y col. 1997). La monocapa se cosecho con rastrillo a los tiempos pi estipulados y el pellet celular fue sujeto a 3 pasos de congelación-descongelación. El título se determino por recuento de UFP en células Hela.

Purificación de virus

Brevemente, monocapas de células HeLa infectadas a 10 MOI fueron cosechadas cuando se observó efecto citopático generalizado (~10 hs. pi.), se descartó el medio y se realizaron 3 pasos de congelación/descongelación consecutivos, luego se cosecharon las células en PBS pH7.4 NP-40 0,1%. Se clarificó a 10000 rpm 20 min a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 40000 rpm 6 h a 4°C sobre colchón de sacarosa 30%. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS pH 7.4.

Ensayo de reducción de placa

Se utilizó un procedimiento ya descripto (Hafenstein, Bowman y col. 2007). Brevemente, stock de concentración 100-1000 UFP fueron incubados 1 h a TA, con CAR o DAF en forma soluble en exceso. Luego, la infectividad de las respectivas alícuotas fue determinada por ensayo de formación de placas.

Ensayo de citotoxicidad

Se siembran las células a ensayar en una placa de 96 pocillos (~ 10^5células/pocillo) y se incubó hasta el otro día a 37 °C en estufa gaseada con 5% CO_2. Luego, se añadieron los diferentes virus en diluciones seriadas 1:10 en el medio de cultivo, por triplicado, al igual que controles no infectados. El volumen final fue 100 µl por pocillo. Se incubo la placa durante durante el tiempo deseado a 37 °C en estufa gaseada con 5% de CO2, luego de lo cual se lavaron las células con PBS pH 7.4 tres veces, y finalmente se añadió el reactivo MTT en relación 10 µl de solución MTT 5 mg/ml en PBS pH 7.4 cada 100 µl de PBS, en cada pocillo de la placa. Se incubó a 37 °C durante 3 hs, y luego se añadió 1 volumen (100 µl) de una solución 20% SDS en dimetil formamida 50% y se dejó la placa en agitación a TA durante 1 h. (para la solubilización del azul de formazán precipitado). Luego se procedió a leer la placa en un lector de placas a 550nm utilizando como referencia de longitud de onda 630nm. Se calcula la mortalidad como:

Mortalidad% =100- (<Abs550nm-Abs630nm>Tratado/<Abs550nm-Abs630nm>Control) x 100

Hemaglutinación

Se obtuvo sangre entera anticuagulada con 15 mM de EDTA, para la obtención de eritrocitos humanos y murinos. Los eritrocitos fueron recuperados por centrifugación, y fueron lavados tres veces con 50 vol de PBS pH 7.4, mediante pasos de centrifugación y resuspensión. Una solución de 0.5% de estos eritrocitos en PBS fue usada para los ensayos. Igual volumen de diluciones de virus semipurificados fueron ensayados en relación 1:1 con la solución de glóbulos rojos al 5% y mezclados en placa de hemaglutinación de 96 pocillos, e incubados 4 hs. a 4°C. El botón de eritrocitos aglutinados en el fondo del pocillo estable a la inclinación de la placa fue considerado positivo para la hemaglutinación.

Animales

Ratones C3H/HeJ y C57BL/6J de 21 días de ambos sexos fueron obtenidos del Jackson Lab (USA) y del bioterio de la Facultad de Veterinaria, UNLP, respectivamente. La variante de C57BL6/J carentes del gen Daf-1 (*knock out* – KO) ha sido previamente descripta (Sun, Funk y col. 1999) y fueron cedidos gentilmente por el Dr Song, Univ Pensylvania, USA. Todos los animales fueron criados en ambiente libre de patógenos, mantenidos en condiciones higiénicas, provistos con alimento y agua autoclavados, sin restricción en la ingesta.

Infección experimental de ratones

Los animales fueron inoculados ip con 100 µl de una solución de PBS conteniendo 10^4 UFP de virus.

Extracción de ARN celular o tisular

Para el aislamiento de ARN se utilizó Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras fueron cosechadas directamente en Trizol, a razón de 100 mg de muestra por ml de Trizol. Las muestras fueron homogeneizadas y a continuación se agregó 0,2 ml de cloroformo por cada 1 ml de Trizol y se agitó vigorosamente por 30 seg seguidos de incubación a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se realizó una centrifugación a 12.000 g por 15 min a 4°C, se tomó la fase superior acuosa y se transfirió a un nuevo tubo. A este se le agrego 1 ml de alcohol isopropílico cada 1 ml original de Trizol y se incubó a TA por 10 min. Luego se volvió a centrifugar a 12.000 g por 8 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces el pellet con etanol 75% seguido por una centrifugación a 12.000 g por 5 min. a 4°C. El pellet final fue secado a TA y resuspendido en 20-50 µl de agua tratada con DEPC.

Retrotranscripción

Se utilizó un procedimiento ya descripto (Rinehart, Gomez y col. 1997) utilizando la enzima retrotranscriptasa del Virus Moloney de la Leucemia Murina (MMLV) (Promega) o alternativamente superscript III (Invitrogen) cuando fue necesario realizar reacciones a mayor temperatura. La mezcla de 20 µl de reacción: 4µl de 5X Buffer MMLV, 1 µl de un mix de dNTPs (25 mM C/U), 1µl de inhibidor de ribonucleasa, 200 unidades de MMLV (o SSIII), 0,5 µg de hexameros al azar (y/o Poly T y/o p*rimers* específicos), 500 ng de ARN, y cantidad necesaria de agua tratada con DEPC libre de RNAsa. La mezcla fue incubada 1 h. a 42°C para MMLV o 55°C para SSIII.

Preparación de bacterias E.coli (DH5) competentes

Se inocularon 100ml de medio de cultivo LB con 1 ml de *E. coli* DH5 en fase estacionaria de crecimiento. Se creció a 37ºC con agitación (200 rpm) hasta DO_{600} 0.6. Se mantuvo en hielo y se centrifugó a 3000 rpm, durante 15 min a 4 ºC. El pellet se resuspendió en

0,5 L de agua bidestilada fría y se centrifugó, y se repitió este paso. El pellet obtenido se resuspendió en 20 ml de glicerol 10% frío y se centrifugó. Finalmente el pellet se resuspendió en 3 ml de glicerol 10% (frío) y se dividió en alícuotas de 50 µl, las cuales se guardaron a -80ºC hasta el momento de ser utilizadas.

Transformación de bacterias *E. coli* competentes por electroporación.

Se utilizaron bacterias *E.coli* DH5 competentes. Se tomaron 2 µl de ligación y se mezcló con las células competentes. Se introdujo la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2cm (BioRad) y se aplicó un pulso eléctrico con los siguientes parámetros: 2.5kV y 5 mseg. Inmediatamente se le agregó medio LB con 20 mM glucosa y se incubó 1 h. a 37ºC, luego se plaqueó en agar LB con el agregado del antibiótico correspondiente.

Extracción de ADN plasmídico

Se obtuvo ADN plasmídico a partir de cultivos de bacterias crecidas en agitación durante la noche en medio LB con el antibiótico correspondiente, a partir de colonias seleccionadas en agar LB con antibiótico. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 13000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, el pellet fue resuspendido agitando vigorosamente en vórtex, en 30 ml de una solución Tris-HCl 25 mM pH8, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, RNAsa (100 mg/ml). Se agregaron 300 ml de solución 0.2N NaOH, 1% SDS, y se mezcló por inversión. Luego de un reposo de 5 min. se agregó 300 ml de solución AcNa 3M pH 5.2 fría, y luego de mezclar se dejó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4ºC y el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo de microcentrífuga limpio. Se adicionó 1 volumen de isopropanol y se centrifugó a 13000rpm durante 10 min a 4ºC. Se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 volumen de etanol 70%, se centrifugó por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar a temperatura ambiente y luego se resuspendió el ADN plasmídico en 30µl de agua calentándolo 15min en baño de 50ºC.

Digestión enzimática de ADN plasmídico

ADN plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción adecuadas en un volumen final de 30ml utilizando 0.5 U de enzima y el buffer indicado por el fabricante.

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Se utilizó el kit de purificación Invitrogen Purelink PCR para la obtención de los insertos y vectores digeridos desde gel de agarosa. Se realizó un gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X. El protocolo de purificación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Obtención de virus recombinantes

Se utilizaron procedimientos ya descriptos (Rinehart, Gomez y col. 1997). Brevemente, se utilizaron enzimas de restricción con sitio único de corte. Los segmentos digeridos fueron incubados con T4 ligasa y utilizados para transformar células competentes.

Secuenciación

La secuencia de CVB1Nm fue obtenida a partir de los clones conteniendo los ADNc del genoma viral utilizando una serie de *primers* diseñados en base a la secuencia publicada de CVB1N, dichos secuencias de *primers* fueron elegidas de modo que equidistan aproximadamente entre si en unos 400-600b. La secuenciación fue realizada usando AmpliTaq Fs *Terminator cycle sequencing kit* (Applied Biosystems) y un ABI Prism 377 DNA secuencer.

Tabla 11. Primers utilizados en la secuenciación del genoma de la variante CVB1Nm

CB1-M1	AAACCAGGGGGCAGTGTGT
CB1-M2	AATAACCCTCGGGAACTCCA
CB1-M3	TATATCCCCACACCAGTGGA
CB1-M4	CAACCTGGGGCCAACAA
CB1-M5	GATACGGTCAGCTCAAAG
CB1-M6	TTCCCTTCATCAGTATTGG
CB1-M7	TCAAGGAATAAGCACTATCC
CB1-M8	AAGGTGTCCCAGTACTATGG
CB1-M9	TCTCTACCACCAGACCCAGA
CB1-M10	TAGTGTTGGGGCCACCCTT
CB1-M11	TGAATGATCAAGAAATTGGTG
CB1-M12	TTGGAGCCAAGTGTCTTCCACC
CB1-M13	CCCAGGGATTGTAACTGG
Poli T	TTTTTTTTTTTTTTT
CB1-1	TATCACGGTACCTTTGUGCGC
CB1-2	TGATGGAATTCCCGCTTGCAT
CB1-3	ATGCAAGCGGGAATTCCATCA
CB1–4	ATGTTGTCCATGGGAACGCTGTT
CB1-5	AACAGCGTTCCCATGGACAACAT
CB1-6	TCCACTGGGCCCTGGTAAAAATT
CB1-7	AATTTTTACCAGGGCCCAGTGGA
CB1-8	TGGCTATGATATCGCATCCAT
CB1-9	GATAGAAGGCACAAGTCAGATACTCCC
CB1-10	AGTGAGGCTGTGAGGGAGTACT

Trascripción *in vitro*

Se realizo según ya se ha descripto (Rinehart, Gomez y col. 1997). Brevemente, una mezcla conteniendo 1 µg del ADNc viral, 1 µl de 10mM NTP mix, 5 µl de 5X *Trancription Buffer*, 1µl de Ditiotreitol 0,75M, 1µl de inhibidor de Ribonucleasa, 50U de T7 RNA polimerasa, y cantidad necesaria de agua libre de RNAsa, se incubó a 37C durante 40 min, luego de lo cual se procedió a la transfección según se detalla mas arriba.

PCR

Se realizó según ya se ha descripto (Rinehart, Gomez y col. 1997). Brevemente, 20 µl de una mezcla de reacción conteniendo 2 µl de 10X Buffer, 1.5 µl de 50 mM $MgCl_2$, 1 µl de un mix de dNTPs 2.5mM c/u, 1 µl de *primers* forward 10 µM, 1µl de *primers* reversos 10 µM, 0.5 U de Taq (ABL/UNQ), 1 µl de molde y agua necesaria fueron sujetos a una serie de incubaciones, siendo la mas frecuente 1 ciclo de 3 min. a 94°C, 35 ciclos de 20 seg. a 94°C, 20 seg. a 55°C y 1 min/kpb a 72°C, seguido de un ultimo ciclo de 10 min. a 72°C.

qPCR

Se utilizaron las siguientes mix comerciales para realizar medidas de ADNc obtenidos por retrotranscripción, utilizando condiciones de reacción sugeridas por el fabricante.

Medidas de CAR y Enterovirus:

Se uso la mix Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG. La mezcla de reacción usada para cada determinación fue: Supermix 12.5 µl, *primer forward* 10 µM 1 µl, *primer reverso* 10 µM 1 µl, 1 µl templado de RT y agua destilada autoclavada a volumen final 25 µl

Medida de Actina:

Se utilizó Taqurate Sybr Green PCR Real-Time master mix Epicentro. La mezcla de reacción por determinación fue: TAQurate PCR MasterMix 12.5 µl, 5 mM *forward primer* 1 µl, 5 mM *primer* reverso 1 µl, ADNc molde de RT 1ul, agua destilada autoclavada a volumen final de 25 µl.

Cuando fue necesario buscar bajas concentraciones del genoma de CVB1 se utilizo el kit Enterovirus 207 Sacase que utiliza una zonda marcada con el fluoróforo Joe™.

La relación *R* entre actina (HSK) y el gen de interés (GOI) fue calculado como:

$$R=(1+E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI(control-tratado)}}/(1+E_{HSK})^{\Delta Ct_{HSK(control-tratado)}}$$

Tabla 12 Primers utilizados en qPCR

Primer	Directo	Reverso
Beta Actina qPCR	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
CAR qPCR	ACCTGAAGGGCTTAACAAGAA	AGTCCCGAAGACCAGGGACC
Enterovirus qPCR	CGGCCCCTGAATGCGGCTAA	GAAACACGGACACCCAAAGTA

Electroforesis de ácidos nucleicos

Se utilizaron geles de agarosa de 1 y 1,5% para corridas de ADN y ARN. El buffer utilizado fue TAE (Tris-acetato 40mM pH 8,5, EDTA 2mM). Los geles contenían 0.5 mg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm y a TA. La composición del buffer de siembra 10X utilizado fue: glicerol 50%, azul de bromofenol (BPB) 1%. Los fragmentos se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (0.5 μg/ml) y los geles fueron fotografiados utilizando luz UV transiluminada y capturando con una cámara Kodak DC10.

Purificación de CAR

CAR se produjo a partir de una línea celular de ratón que sobrexpresa CAR de las que fue purificado por cromatografía de afinidad con el *knob* del adenovirus 12 como ya se ha descripto (He, Chipman y col. 2001). Brevemente, el *knob* del AD12 se produjo en grandes cantidades en *E. coli* BL21DE3 transformando la mismas con un plásmido, cedido gentilmente por Dr. Paul Freimouth, conteniendo clonado el ORF de dicha proteína unida a un tag N-terminal 6His, con resistencia a ampicilina como medio de selección. Una colonia transformada se inoculo en ~ 200 ml de caldo LB con ampicilina que se incubó en agitación (100 rpm 37°C) durante la noche, este se usó luego de inoculo de cultivos de 500 ml de LB con ampicilina, hasta crecer a fase midlog (OD_{600} = 0.5). A continuación, se agrego a 0.4 mM IPTG previamente cambiando la temperatura del cultivo a 18-20°C, y se cultivó aproximadamente por 5 hs. adicionales. Luego se cosecharon las células por centrifugación en una Sorvall SLA-3000 por 10 min a 7000 rpm. Se resuspendió en buffer 20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazol, pH 7.4 y se agregaron 2-3 mg de lisozima, incubándose 10 min a TA y se procedió a romper las células por sonicación, con 5 ciclos de máxima potencia de 10 seg con 1 min de enfriamiento en baño de hielo. Se agregó 1mg DNAsa cuando se observó viscoso el medio. Luego se clarificó centrifugando en Sorvall SS-34 rotor a 4°C 7500 rpm 15min. El sobrenadante se pasó por una columna de intercambio aniónico DEAE *sepharosa* y el fluente luego se pasó por una columna de Ni+2 (GE HisTrap). Esta última columna se lavó con buffer 20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazol, pH 7.4. Luego la proteína (*knob* Ad12) se eluyó con buffer 20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl y 500 mM imidazol. Fracciones conteniendo la proteína fueron dializadas contra PBS. Finalmente 5 mg de esta proteína fueron usados cada 1gr de gel de *sepharosa* activada con CNBr (Sigma) para generar la columna de afinidad, según protocolo del fabricante.

CAR fue obtenido de células de ratón establemente transfectadas con un BAC (cromosoma bacteriano artificial) conteniendo el gen humano CAR (GenBank accession AF200465), las mismas fueron cultivadas en medio MEM 10% SFB aditivado con el antibiótico

G418 (Geneticin – Gibco), como agente de selección. El cultivo fue amplificado hasta unas 20 botellas T125 confluentes. Las células se cosecharon en solución de lisis PBS TritonX100 1% y *cocktail* inhibidor de proteasas, se colectaron los lisados celulares, se incubaron en agitación 30 min a TA y se aclaró por centrifugación en Sorvall ss-34 a 7500 rpm por 15min a 4°C. El sobrenadante luego fue pasado por la columna de afinidad en la que está ligado el *knob* del adenovirus 12 (AD12), luego de lo cual se lavó la columna con PBS NP-40 0.05%. Por último se eluyó CAR con tampón glicina pH 2,5 que fue inmediatamente neutralizado al gotearse sobre Tris-CL 1M pH 9 a razón de 10:1 vol eluato/vol buffer Tris. Se colectaron las fracciones y se dializaron contra PBS pH=7.4.

DAF fue expresado en *Pichia pastoris* como una proteína conteniendo una cola C-terminal 6xHis y purificada cromatografía de afinidad con Ni+2 como ya fue descripto (He, Lin y col. 2002). Brevemente *Pichia pastoris* cepa SMD 1168 transformada con ADN codificante para SCR1,2,3,4, clonado en el plásmido pPICZa, fue inducida en medio con metanol, con lo cual DAF fue expresado y liberado al medio de cultivo por dichas células. El cultivo fue centrifugado Sorvall SLA-3000 por 10 min a 7000 rpm y el sobrenadante conteniendo los productos de secreción fue pasado por columna cromatografica de afinidad Ni+2 (GE HisTrap), luego de lo cual, previo lavado con buffer 20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazol, pH 7.4, y luego DAF fue eluido de la columna usando buffer 20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl y 500 mM imidazol. Las fracciones eluidas fueron dializadas contra PBS, y la proteína cuantificada espectrofotometricamente a 280nm.

Técnicas histológicas

Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído 4% buferado en PBS considerando 1 h por mm de tejido a TA para ser luego procesadas para rutina histológica según ya se ha descrito (Gomez, Lascano y col. 1991).

Score patogénico

La pancreatitis y la miocarditis se graduó de la siguiente manera: 0 corresponde a ausencia de infiltración celular y necrosis; 1 corresponde a inflamación incipiente y focal (solo uno o dos focos en todo la sección; 2, inflamación leve (menos del 25 % de la sección afectada); 3, inflamación media (entre un 25-50% de la sección afectada); 4, inflamación severa (más del 50% de la sección de tejido afectada).

Análisis *in silico*

Alineamientos

Para realizar alineamientos se utilizo la aplicación AlignX del programa del Vector NTI 10.1.1. Algunos *primers* se diseñaron usando Primer Premier 5.00 y chequeados *in silico* (PCR

virtual) usando el programa antes mencionado. Se utilizaron servidores del NCBI *on-line* para utilizar las herramientas Blastn, Blastp y Cobalt, con el fin de realizar búsquedas y alineamientos.

La entropía de Shannon, H(X), calculada sobre alineamientos aminoacídicos, donde la probabilidad P(X) se aproxima a la frecuencia *f*(x) donde L es el largo de la columna y N(x) es el número de se calculó como:

$$H(X) = -\sum_{x} P(x) \ln P(x), \qquad P(x) \approx f(x) = \frac{N(x)}{L}$$

Se normalizó este valor como *HN(X)=H(X)/ln(21),* (20aa más el *gap* -) y sobre la columna de alineamiento como *Hn(X)=H(X)/ln(y),* donde *y* es el número de caracteres diferentes hallados en la columna (número de aa diferentes más el *gap* –, si es hallado) .

Uso de modelos 3D cristalográficos y cryo-EM.

El virus coxsackie B3 con fenotipo miocardítico para el cual se conoce la estructura por cristalografía de rayos X presenta más del 80% de homología en la secuencia con respecto a CVB1. Después de obtener la secuencia de CVB1Nm, la estructura del CVB3 fue usada para mapear la localización de los restos aminoacídicos diferentes de la región P1 entre las variantes intratípicas de coxsackievirus B1 (1N y 1Nm), usando el programa Chimera. Las mutaciones fueron marcadas sobre la superficie viral y fueron mostradas en mapas de coordenadas polares 2 dimensiones usando el programa RIVEM, proyectando simultáneamente sobre la superficie la densidad de los receptores virales obtenida mediante la reconstrucción cryo-EM.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como [media ± error estándar de la media] y se analizaron por medio de un análisis de varianza seguido de prueba de comparación múltiple de Bonferroni para determinar diferencias significativas entre los grupos. Valores de $p<0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

REFERENCIAS

Andino, R., N. Boddeker, y col. (1999). "Intracellular determinants of picornavirus replication." Trends Microbiol **7**(2): 76-82.

Aretz, H. T., M. E. Billingham, y col. (1987). "Myocarditis. A histopathologic definition and classification." American Journal of Cardiovascular Pathology **1**(1): 3-14.

Baboonian, C., M. J. Davies, y col. (1997). "Coxsackie B viruses and human heart disease." Curr Top Microbiol Immunol **223**: 31-52.

Badorff, C., B. Fichtlscherer, y col. (2000). "Nitric oxide inhibits dystrophin proteolysis by coxsackieviral protease 2A through S-nitrosylation: A protective mechanism against enteroviral cardiomyopathy." Circulation **102**(18): 2276-81.

Badorff, C. y K. U. Knowlton (2004). "Dystrophin disruption in enterovirus-induced myocarditis and dilated cardiomyopathy: from bench to bedside." Med Microbiol Immunol **193**(2-3): 121-6.

Baker, T. S., N. H. Olson, y col. (1999). "Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs." Microbiol Mol Biol Rev **63**(4): 862-922, table of contents.

Basso, C., F. Calabrese, y col. (2001). "Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings." Cardiovasc Res **50**(2): 290-300.

Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, y col. (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." Science **275**(5304): 1320-3.

Bergelson, J. M., J. G. Mohanty, y col. (1995). "Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55)." J Virol **69**(3): 1903-6.

Bonderoff, J. M. y R. E. Lloyd (2008). "CVB Translation: Lessons from the Polioviruses." Curr Top Microbiol Immunol **323**.

Bowles, N. E. y J. A. Towbin (2000). "Molecular Aspects of Myocarditis." Curr Infect Dis Rep **2**(4): 308-314.

Brown, D. M., C. T. Cornell, y col. (2005). "An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication." J Virol **79**(18): 11962-73.

Bruu, A. L. (2002). Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, Echoviruses and newers enteroviruses. A Practical Guide to Clinical Virology. L. R. Haaheim, J. R. Pattison and R. J. Whitley, John Wiley & Sons, Ltd.

Büchen-Osmond, C. (2006). "ICTVdB - The Universal Virus Database, developed for the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ", from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.052.0.01.htm#quickIDX0.

Caggana, M., P. Chan, y col. (1993). "Identification of a single amino acid residue in the capsid protein VP1 of coxsackievirus B4 that determines the virulent phenotype." J Virol **67**(8): 4797-803.

Calabrese, F. y G. Thiene (2003). "Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects." Cardiovasc Res **60**(1): 11-25.

Cameron-Wilson, C. L., Y. A. Pandolfino, y col. (1998). "Nucleotide sequence of an attenuated mutant of coxsackievirus B3 compared with the cardiovirulent wildtype: assessment of candidate mutations by analysis of a revertant to cardiovirulence." Clin Diagn Virol **9**(2-3): 99-105.

Chapman, N. M., A. I. Ramsingh, y col. (1997). "Genetics of coxsackievirus virulence." Curr Top Microbiol Immunol **223**: 227-58.

Chow, L. H., K. W. Beisel, y col. (1992). "Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury." Laboratory Investigation **66**(1): 24-31.

Chua, B. H., P. Phuektes, y col. (2008). "The molecular basis of mouse adaptation by human enterovirus 71." J Gen Virol **89**(Pt 7): 1622-32.

D'Ambrosio, A., G. Patti, y col. (2001). "The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review." Heart **85**(5): 499-504.

Dan, M. y J. K. Chantler (2005). "A genetically engineered attenuated coxsackievirus B3 strain protects mice against lethal infection." J Virol **79**(14): 9285-95.

del Angel, R. M., A. G. Papavassiliou, y col. (1989). "Cell proteins bind to multiple sites within the 5' untranslated region of poliovirus RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(21): 8299-303.

Domingo, E., V. Martin, y col. (2008). "Coxsackieviruses and quasispecies theory: evolution of enteroviruses." Curr Top Microbiol Immunol **323**: 3-32.

Domingo, E., V. Martin, y col. (2006). "Viruses as quasispecies: biological implications." Curr Top Microbiol Immunol **299**: 51-82.

Dunn, J. J., N. M. Chapman, y col. (2000). "Genomic determinants of cardiovirulence in coxsackievirus B3 clinical isolates: localization to the 5' nontranslated region." J Virol **74**(10): 4787-94.

Esfandiarei, M. y B. M. McManus (2008). "Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis." Annu Rev Pathol **3**: 127-55.

Feldman, A. M. y D. McNamara (2000). "Myocarditis." N Engl J Med **343**(19): 1388-98.

Fields, B. N. (2001). Fields - Virology Lippincott Williams & Wilkins Publishers.

Freimuth, P., L. Philipson, y col. (2008). "The coxsackievirus and adenovirus receptor." Curr Top Microbiol Immunol **323**: 67-87.

Fry, E. E., N. J. Knowles, y col. (2003). "Crystal structure of Swine vesicular disease virus and implications for host adaptation." J Virol **77**(9): 5475-86.

Fukuchi, M., S. N. Hussain, y col. (1998). "Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure: their relation to lesion site and beta-adrenergic receptor therapy." Circulation **98**(2): 132-9.

Furukawa, Y., K. Kobuke, y col. (2001). "Role of cytokines in autoimmune myocarditis and cardiomyopathy." Autoimmunity **34**(3): 165-8.

Gamarnik, A. V. y R. Andino (1998). "Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus." Genes Dev **12**(15): 2293-304.

Gauntt, C. y S. Huber (2003). "Coxsackievirus experimental heart diseases." Front Biosci **8**: e23-35.

Gauntt, C. J., H. M. Arizpe, y col. (1995). "Molecular mimicry, anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies, and myocarditis." J Immunol **154**(6): 2983-95.

Gauntt, C. J. y M. A. Pallansch (1996). "Coxsackievirus B3 clinical isolates and murine myocarditis." Virus Res **41**: 89–99.

Gomez, R. M. y M. I. Berria (1988). "[Viral myocarditis]." Medicina (B Aires) **48**(4): 435-9.

Gomez, R. M., C. G. Castagnino, y col. (1992). "Extracellular matrix remodelling after coxsackievirus B3-induced murine myocarditis." Int J Exp Pathol **73**(5): 643-53.

Gomez, R. M., X. Cui, y col. (1993). "Differential behaviour in pancreas and heart of two coxsackievirus B3 variants." Intervirology **36**(3): 153-60.

Gomez, R. M., E. F. Lascano, y col. (1991). "Murine acinar pancreatitis preceding necrotizing myocarditis after Coxsackievirus B3 inoculation." J Med Virol **35**(2): 71-5.

Haas, G. J. (2001). "Etiology, evaluation, and management of acute myocarditis." Cardiol Rev **9**(2): 88-95.

Hafenstein, S., V. D. Bowman, y col. (2007). "Interaction of decay-accelerating factor with coxsackievirus B3." J Virol **81**(23): 12927-35.

Hafenstein, S., V. D. Bowman, y col. (2007). "Interaction of decay-accelerating factor with coxsackievirus b3." J Virol **81**(23): 12927-35.

Harvala, H., H. Kalimo, y col. (2005). "Tissue tropism of recombinant coxsackieviruses in an adult mouse model." J Gen Virol **86**(Pt 7): 1897-907.

Harvala, H., H. Kalimo, y col. (2002). "Mapping of tissue tropism determinants in coxsackievirus genomes." J Gen Virol **83**(Pt 7): 1697-706.

He, Y., P. R. Chipman, y col. (2001). "Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor." Nat Struct Biol **8**(10): 874-8.

He, Y., F. Lin, y col. (2002). "Structure of decay-accelerating factor bound to echovirus 7: a virus-receptor complex." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10325-9.

Heim, A., S. Zeuke, y col. (2000). "Transient induction of cytokine production in human myocardial fibroblasts by coxsackievirus B3." Circ Res **86**(7): 753-9.

Hellen, C. U., T. V. Pestova, y col. (1994). "The cellular polypeptide p57 (pyrimidine tract-binding protein) binds to multiple sites in the poliovirus 5' nontranslated region." J Virol **68**(2): 941-50.

Hunziker, I. P., C. T. Cornell, y col. (2007). "Deletions within the 5'UTR of coxsackievirus B3: consequences for virus translation and replication." Virology **360**(1): 120-8.

Iizuka, N., H. Yonekawa, y col. (1991). "Nucleotide sequences important for translation initiation of enterovirus RNA." J Virol **65**(9): 4867-73.

Ishii, T., K. Shiroki, y col. (1998). "A new internal ribosomal entry site 5' boundary is required for poliovirus translation initiation in a mouse system." J Virol **72**(3): 2398-405.

Ishii, T., K. Shiroki, y col. (1999). "Identification of a new element for RNA replication within the internal ribosome entry site of poliovirus RNA." J Gen Virol **80 (Pt 4)**: 917-20.

Jimes, S. y R. M. Jamison (1983). "Coxsackievirus B4: in vitro genetic markers and virulence." Arch Virol **77**(1): 1-11.

Johansen, L. K. y C. D. Morrow (2000). "Inherent instability of poliovirus genomes containing two internal ribosome entry site (IRES) elements supports a role for the IRES in encapsidation." J Virol **74**(18): 8335-42.

Kandolf, R. y P. H. Hofschneider (1985). "Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Coxsackie B3 virus: full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(14): 4818-22.

Kandolf, R., M. Sauter, y col. (1999). "Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system." Virus Res **62**(2): 149-58.

Katpally, U. y T. J. Smith (2007). "Pocket factors are unlikely to play a major role in the life cycle of human rhinovirus." J Virol **81**(12): 6307-15.

Kim, K. S., S. Tracy, y col. (2005). "5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA." J Virol **79**(11): 7024-41.

Kirkegaard, K. (1990). "Mutations in VP1 of poliovirus specifically affect both encapsidation and release of viral RNA." J Virol **64**(1): 195-206.

Klingel, K., C. Hohenadl, y col. (1992). "Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(1): 314-8.

Knowlton, K. U., E. S. Jeon, y col. (1996). "A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3." J Virol **70**(11): 7811-8.

Kubota, T., C. F. McTiernan, y col. (1997). "Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice." J Card Fail **3**(2): 117-24.

Kumar, V., N. Fausto, y col. (2004). Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease, Elsevier.

Lauer, B., M. Schannwell, y col. (2000). "Antimyosin autoantibodies are associated with deterioration of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic myocarditis." J Am Coll Cardiol **35**(1): 11-8.

Li, Y., T. Bourlet, y col. (2000). "Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy." Circulation **101**(3): 231-4.

Lijnen, P. J., V. V. Petrov, y col. (2000). "Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1)." Mol Genet Metab **71**(1-2): 418-35.

Lim, B. K., D. Xiong, y col. (2008). "Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart." J Clin Invest **118**(8): 2758-70.

Liu, J., T. Miwa, y col. (2005). "The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo." J Exp Med **201**(4): 567-77.

Miwa, T., M. A. Maldonado, y col. (2007). "Decay-accelerating factor ameliorates systemic autoimmune disease in MRL/lpr mice via both complement-dependent and -independent mechanisms." Am J Pathol **170**(4): 1258-66.

Miwa, T. y W. C. Song (2001). "Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases." Int Immunopharmacol **1**(3): 445-59.

Muckelbauer, J. K., M. Kremer, y col. (1995). "The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 A resolution." Structure **3**(7): 653-67.

Nalbantoglu, J., G. Pari, y col. (1999). "Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells." Hum Gene Ther **10**(6): 1009-19.

Nugent, C. I. y K. Kirkegaard (1995). "RNA binding properties of poliovirus subviral particles." J Virol **69**(1): 13-22.

Opavsky, M. A., J. Penninger, y col. (1999). "Susceptibility to myocarditis is dependent on the response of alphabeta T lymphocytes to coxsackieviral infection." Circ Res **85**(6): 551-8.

Orthopoulos, G., K. Triantafilou, y col. (2004). "Coxsackie B viruses use multiple receptors to infect human cardiac cells." J Med Virol **74**(2): 291-9.

Pallansch, M. A. y R. P. Roos (2001). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. Fields - Virology P. M. Bernard N. Fields, MD Howley, Diane E., Ph.D. Griffin, Robert A., Ph.D. Lamb, Malcolm A., MD Martin, Bernard Roizman, Stephen E., MD Straus, David M., Ph.D. Knipe, Lippincott Williams & Wilkins**:** 589-629.

Perrone, S. V. y R. M. Gomez (2003). Miocarditis. Cardiología. B. Mautner. Buenos Aires, Grupo Guia**:** 542-546.

Pettersen, E. F., T. D. Goddard, y col. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-12.

Pfeiffer, J. K. y K. Kirkegaard (2003). "A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7289-94.

Pummerer, C. L., K. Luze, y col. (1996). "Identification of cardiac myosin peptides capable of inducing autoimmune myocarditis in BALB/c mice." J Clin Invest **97**(9): 2057-62.

Racaniello, V. (2001). Picornaviridae: The Viruses and Their Replication Fields - Virology P. M. Bernard N. Fields, MD Howley, Diane E., Ph.D. Griffin, Robert A., Ph.D. Lamb, Malcolm A., MD Martin, Bernard Roizman, Stephen E., MD Straus, David M., Ph.D. Knipe, Lippincott Williams & Wilkins**:** 559-588.

Ramsingh, A., H. Araki, y col. (1992). "Identification of candidate sequences that determine virulence in Coxsackievirus B4." Virus Res **23**(3): 281-92.

Ramsingh, A. I. y D. N. Collins (1995). "A point mutation in the VP4 coding sequence of coxsackievirus B4 influences virulence." J Virol **69**(11): 7278-81.

Rey, L., V. Lambert, y col. (2001). "Detection of enteroviruses ribonucleic acid sequences in endomyocardial tissue from adult patients with chronic dilated cardiomyopathy by a rapid RT-PCR and hybridization assay." J Med Virol **64**(2): 133-40.

Rezaikin, A. B., A. B. Novoselov, y col. (2009). "[Mapping of point mutations leading to loss of virus ECH011 affinity for receptor DAF (CD55)]." Vopr Virusol **54**(1): 41-4.

Rinehart, J. E., R. M. Gomez, y col. (1997). "Molecular determinants for virulence in coxsackievirus B1 infection." J Virol **71**(5): 3986-91.

Rose, N. R. y S. L. Hill (1996). "The pathogenesis of postinfectious myocarditis." Clin Immunol Immunopathol **80**(3 Pt 2): S92-9.

Rose, N. R., L. J. Wolfgram, y col. (1986). "Postinfectious autoimmunity: two distinct phases of coxsackievirus B3-induced myocarditis." Annals of the New York Academy of Sciences **475**: 146-56.

Rossi, M. A. y A. C. Souza (1999). "Is apoptosis a mechanism of cell death of cardiomyocytes in chronic chagasic myocarditis?" Int J Cardiol **68**(3): 325-31.

Rossmann, M. G., FumioArisaka, y col. (2007). "From structure of the complex to understanding of the biology." Acta Crystallographica.

Schmid, M. y E. Wimmer (1994). "IRES-controlled protein synthesis and genome replication of poliovirus." Arch Virol Suppl **9**: 279-89.

Schneemann, A. (2006). "The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly." Annu Rev Microbiol **60**: 51-67.

Schwimmbeck, P. L., S. A. Huber, y col. (1997). "Roles of T cells in coxsackievirus B-induced disease." Curr Top Microbiol Immunol **223**: 283-303.

Selinka, H. C., A. Wolde, y col. (2004). "Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism." Med Microbiol Immunol **193**(2-3): 127-31.

Shafren, D. R., R. C. Bates, y col. (1995). "Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment." J Virol **69**(6): 3873-7.

Sharma, R., A. J. Coats, y col. (2000). "The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1." Int J Cardiol **72**(2): 175-86.

Shieh, J. T. y J. M. Bergelson (2002). "Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells." J Virol **76**(18): 9474-80.

Shimojo, T., M. Hiroe, y col. (1999). "Nitric oxide induces apoptotic death of cardiomyocytes via a cyclic-GMP-dependent pathway." Exp Cell Res **247**(1): 38-47.

Sonenberg, N. y T. E. Dever (2003). "Eukaryotic translation initiation factors and regulators." Curr Opin Struct Biol **13**(1): 56-63.

Spiller, O. B., I. G. Goodfellow, y col. (2000). "Echoviruses and coxsackie B viruses that use human decay-accelerating factor (DAF) as a receptor do not bind the rodent analogues of DAF." J Infect Dis **181**(1): 340-3.

Spotnitz, M. D. y M. Lesch (2006). "Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus) myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis." Prog Cardiovasc Dis **49**(1): 42-57.

Stadnick, E., M. Dan, y col. (2004). "Attenuating mutations in coxsackievirus B3 map to a conformational epitope that comprises the puff region of VP2 and the knob of VP3." J Virol **78**(24): 13987-4002.

Stanway, G., F. Brown, y col. (2004). Picornaviridae. Virus taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball. London, United Kingdom, Elsevier**:** 757-778.

Stanway, G., Brown, F., Christian, P., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lemon, S.M., Minor, P.D., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C. and Skern, T. (2004). "Picornaviridae. In: "Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV"." Elsevier/Academic Press, London.

Sun, X., C. D. Funk, y col. (1999). "Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 628-33.

Tracy, S. y C. Gauntt (2008). "Group B coxsackievirus virulence." Curr Top Microbiol Immunol **323**: 49-63.

Tracy, S., K. Hofling, y col. (2000). "Group B coxsackievirus myocarditis and pancreatitis: connection between viral virulence phenotypes in mice." J Med Virol **62**(1): 70-81.

Tu, Z., N. M. Chapman, y col. (1995). "The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region." J Virol **69**(8): 4607-18.

Verdaguer, N., M. A. Jimenez-Clavero, y col. (2003). "Structure of swine vesicular disease virus: mapping of changes occurring during adaptation of human coxsackie B5 virus to infect swine." J Virol **77**(18): 9780-9.

Vignuzzi, M., J. K. Stone, y col. (2005). "Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications." Virus Res **107**(2): 173-81.

Wessely, R., K. Klingel, y col. (1998). "Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy." J Clin Invest **102**(7): 1444-53.

Williams, D. T., Y. Chaudhry, y col. (2004). "Interactions of decay-accelerating factor (DAF) with haemagglutinating human enteroviruses: utilizing variation in primate DAF to map virus binding sites." J Gen Virol **85**(Pt 3): 731-8.

Xiao, C. y M. G. Rossmann (2006). "Interpretation of electron density with stereographic roadmap projections." J Struct Biol.

Yun, S. H., J. O. Shin, y col. (2007). "Change in the cells that express connective tissue growth factor in acute Coxsackievirus-induced myocardial fibrosis in mouse." Virus Res **126**(1-2): 62-8.

Zhang, H., N. W. Blake, y col. (1995). "A single amino acid substitution in the capsid protein VP1 of coxsackievirus B3 (CVB3) alters plaque phenotype in Vero cells but not cardiovirulence in a mouse model." Arch Virol **140**(5): 959-66.

Zhang, H., G. E. Yousef, y col. (1994). "Characterization of a murine model of myocarditis induced by a reactivated coxsackievirus B3." Int J Exp Pathol **75**(2): 99-110.

Zhong, Z., X. Li, y col. (2008). "Mutations at nucleotides 573 and 579 within 5'-untranslated region augment the virulence of coxsackievirus B1." Virus Res **135**(2): 255-9.

Anexos

Abreviaturas usadas

1N	CVB1N
1Nm	CVB1Nm
3'UTR	En el ARN viral la región 3 prima no traducida, en la literatura también abreviada como 3'NCR (*non coding region*)
5'UTR	En el ARN viral la región 5 prima no traducida, en la literatura también abreviada como 5'NCR (*non coding region*)
aa	Aminoácido
Blast	*Basic Local Alignment Search Tool*. Blastp para alineamiento de polipéptidos, Blastn para alineamiento de secuencia de ácidos nucleicos
CAR	Receptor de coxsackievirus y adenovirus humano
Cobalt	*Constraint-based Multiple Alignment Tool*. Herramienta de alineamiento múltiple del NCBI.
CMD	Cardiomiopatía dilatada.
Cryo-EM	Microscopia electrónica en fase criogénica
CV	Coxsackievirus
CVB	Coxsackievirus tipo B
DAF	*Decay Accelerating Factor* , factor acelerador de decaimiento, proteína de control de complemento usada por CVB y otros EV como receptor
DEPC	Dietil pirocarbonato.
dpi	Días post inoculación
EV	Enterovirus
GOI	Gen de interés.
HyE	Hematoxilina y eosina, tincion.
hs	horas
HSK	*Housekeeping gene*: gen de expresion constitutiva usado de referencia.
ip	Intraperitoneal
KO	Del inglés *knock out*, animal deficiente de la expresión de un gen obtenido por manipulación genética.
LB	Medio base de crecimiento de bacterias
MEM	Medio Mínimo Esencial, para cultivo celular eucariota.
min.	Minutos
MMLV	Murine moloney leukemya virus, virus del cual se obtiene una retrotranscriptasa llamada por idéntico nombre, MMLV.
MTT	Colorante, Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2il)-Difenil tetrazoilo
MV	Miocarditis viral.
nt/nts	Nucleótido/nucleótidos.
pb	Par de bases nucleotidicas.
PBS	Solucion buferada fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PFU	Unidades formadoras de placa.
pi	Pos inoculación.
pN14	Plásmido original que contiene el ADNc del genoma de CVB1N (Nomoto).
RT	Retrotranscripción *in vitro.*
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de PCR
RT-qPCR	Retrotranscripción seguida de qPCR.
seg	segundos
SVDV	*Swine vesicular disease virus*, virus de la enfermedad vesicular porcina, virus altamente relacionado a CVB5
T7 ARNpol	ARN polimerasa de bacteriofago T7
TA	Temperatura ambiente.
VP	Proteina viral de capside
WT	*wild type,* fenotipo salvaje